

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Dottorato di ricerca in Scienza del farmaco- XXIV ciclo

**SVILUPPO DI NUOVE PROCEDURE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE
DI CONTAMINANTI NEI CIBI, IN RELAZIONE A PROBLEMI EMERGENTI DI
SICUREZZA ALIMENTARE.**

Tutor:

**Ch.ma Prof.ssa
Stefania Albrizio**

Dottoranda:

Dott. Oriella Gennari

Coordinatore del corso:

**Ch.ma Prof.ssa
Maria Valeria D'Auria**

Indice

Introduzione	3
Capitolo 1	5
1.1 La sicurezza alimentare	5
1.2 Materiali destinati al contatto con gli alimenti	12
1.3 Normativa in materia di “materiali a contatto con gli alimenti”	19
Capitolo 2	27
2.1 I distruttori endocrini	27
2.2 Bisfenoli come interferenti endocrini	31
2.3 Alchilfenoli come interferenti endocrini	42
2.4 Bisfenoli ed Alchilfenoli negli alimenti	47
2.5 Procedure analitiche per la determinazione nei cibi dei livelli di sostanza con attività endocrina	56
2.5.1 Determinazione dei livelli di bisfenoli in campioni di latte	56
2.5.2 Valutazione del rilascio di bisfenoli da biberon in polieteresulfone	71
2.5.3 Sviluppo e validazione di un metodo analitico per il monitoraggio simultaneo dei livelli di bisfenoli in pomodori in scatola	84
2.5.4 Validazione di un metodo per la determinazione simultanea di 4-n-nonilfenolo, 4-n-ottilfenolo, 4-tert.-ottilfenolo e 4-n-ottilfenolo monoelossilato tramite HPLC-DAD in campioni di acqua	95
Capitolo 3 – Sviluppo di un metodo GC-FID per la determinazione di Stirene residuale in bicchieri in plastiche polistireniche	112
Capitolo 4 - Sviluppo di una procedura analitica per il controllo della melammina e composti correlati in integratori alimentari	137
Capitolo 5 – Descrizione delle tecniche	163
5.1 Estrazione in fase solida	163
5.2 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)	166
5.3 Gas Cromatografia (GC)	172
5.4 Spettrometria di massa	177

Introduzione

Le emergenze sanitarie che in questi ultimi anni hanno interessato il settore alimentare sono state numerose (biberon al bisfenolo A, melammina in latte destinato all'infanzia, salmoni scozzesi con elevate concentrazione di policlorurati bifenili, pesce spada con alti livelli di metilmercurio, polli alla diossina, al di là dei normali pericoli derivanti dalla contaminazione da parte di microrganismi diversi) rendendo imperante vigilare sulla qualità e sicurezza degli alimenti e, contemporaneamente, valutare l'esposizione degli esseri umani a contaminanti chimici attraverso la dieta.

I contaminanti alimentari possono avere origine naturale, ad es. le micotossine, o antropica, e cioè essere fitofarmaci e pesticidi utilizzati in agricoltura, composti di origine industriale, metalli pesanti a vario titolo presenti nelle matrici ambientali, sostanze rilasciate dai materiali di confezionamento o destinati a venire in contatto con gli alimenti.

Durante il corso di Dottorato, l'attività di ricerca ha avuto come obiettivo la messa a punto e validazione di metodiche per la determinazione analitica di differenti contaminanti in diverse matrici alimentari, con particolare riguardo alle sostanze contaminanti con attività di Distruttori Endocrini (bisfenoli e alchilfenoli). Su tali sostanze, infatti, di recente, si è concentrata l'attenzione di molti ricercatori in quanto numerosi studi epidemiologici hanno suggerito una correlazione fra esposizione ambientale e/o lavorativa a EDC ed insorgenza di patologie, quali: infertilità maschile, abortività precoce, patologie uterine (endometriosi), malformazioni dell'apparato riproduttivo (ipospadia, criptorchidismo), aumentata suscettibilità ai tumori del testicolo e ritardi dello sviluppo infantile, con meccanismi di azione degli EDC non ancora del tutto chiariti.

Altri contaminanti alimentari presi in considerazione, durante l'attività di ricerca, sono stati lo stirene e la melammina, anch'essi sospettati di avere effetti gravi sull'organismo umano.

L'analisi qualitativa e quantitativa dei diversi analiti nelle diverse matrici ha previsto l'impiego di tecniche cromatografiche, quali HPLC e GC, e della spettrometria di massa mentre per la fase di estrazione degli analiti dalle matrici è stata prevalentemente utilizzata la tecnica di estrazione in fase solida (SPE). Nello sviluppo delle diverse metodiche si è tenuto conto della possibilità di utilizzarle per un'analisi routinaria delle matrici alimentari selezionate e pertanto sono stati presi in considerazione parametri quali la rapidità di esecuzione e l'economicità delle apparecchiature e dei materiali utilizzati. Allo scopo di garantire l'affidabilità dei risultati analitici ottenuti, tutti i metodi sviluppati sono stati validati in termini di accuratezza e precisione, limite di rivelazione (LOD), limite di quantificazione (LOQ), linearità e selettività, recupero dell'analita e robustezza.

Capitolo 1

1.1 *La sicurezza alimentare*

La sicurezza alimentare è, attualmente, un tema di enorme importanza sanitaria, sociale ed economica. Al fine di salvaguardare la salute dei consumatori è indispensabile definire e controllare i requisiti necessari di salubrità di ciascun prodotto alimentare e identificare, classificare e valutare i pericoli ed i rischi per la salute umana derivanti dalla possibile presenza negli alimenti di additivi o sostanze contaminanti. Queste ultime possono trovarsi nell'alimento a causa della migrazione dai materiali utilizzati per il confezionamento o durante i processi di produzione e trasformazione a cui un alimento è sottoposto o derivare dall'ambiente in quanto contaminanti ambientali della catena alimentare.

Per la FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Agricoltura e l'Alimentazione), “esiste sicurezza alimentare quando tutte le persone hanno in tutti i momenti accesso fisico ed economico agli alimenti innocui e nutritivi per soddisfare le proprie necessità e preferenze alimentari, al fine di ottenere una vita attiva e sana”. Esiste, quindi, sicurezza alimentare se si rispettano quattro condizioni:

1. Offerta e disponibilità di alimenti adeguati;
2. Stabilizzazione dell'offerta senza fluttuazioni e variazioni in funzione della stagione e dell'anno;
3. Accesso agli alimenti e capacità di acquisto;
4. Buona qualità.

Nel contesto dei Paesi dell'Unione Europea, il rispetto delle prime tre condizioni è ormai accettato, pertanto si può affermare che esiste sicurezza alimentare quando gli alimenti godono di buone condizioni igieniche e sono innocui per la salute.

I campi della sicurezza e qualità alimentare sono piuttosto ampi; per abbracciarli totalmente sarebbe necessaria un'analisi completa della catena alimentare, dal

momento in cui l'alimento viene prodotto, considerando anche le materie prime, fino al consumo, passando per il processamento, la formulazione, l'imballaggio, la distribuzione e la vendita.

In generale, i rischi relativi alla sicurezza alimentare si possono classificare in due ampie categorie:

La contaminazione biotica (per esempio: batteri, funghi, virus o parassiti). Questo tipo di contaminazione può provocare intossicazioni alimentari, che si manifestano con sintomi più o meno gravi;

La contaminazione abiotica, che include sostanze chimiche di origine naturale (micotossine), residui di farmaci per uso veterinario (antibiotici ed ormoni), metalli pesanti (mercurio) o altri residui (pesticidi) introdotti in forma involontaria o accidentale negli alimenti durante la coltivazione o la creazione, la lavorazione, il trasporto e l'imballaggio.

Il rischio per la salute, correlato alla presenza di un contaminante, dipende da molti fattori tra cui l'assorbimento e la tossicità della sostanza, il livello di tale sostanza nel cibo, la quantità di cibo contaminato consumata e la durata dell'esposizione. Le persone hanno inoltre una diversa sensibilità ai contaminanti e altri fattori della dieta possono influire sulle conseguenze tossiche del contaminante. Un'ulteriore complicazione per quanto riguarda la valutazione del rischio per la salute umana derivante da contaminanti chimici è data dal fatto che molti degli studi sulla loro tossicità devono necessariamente essere estrapolati da esperimenti effettuati su animali e non vi è certezza sul fatto che queste sostanze abbiano gli stessi effetti anche sugli esseri umani (EUFIC 2004).

La gestione del rischio è marcatamente diversa negli USA e nella UE. Negli USA infatti vige il principio in base al quale un alimento è considerato sicuro fino a prova contraria.

A livello internazionale, per ragioni di libero commercio e di rispetto delle regole del WTO (World Trade Organization) vigono le regole del Codex Alimentarius, organismo congiunto FAO (Food and Agriculture Organization) e WTO, che si avvale del JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) come organo scientifico di valutazione, per uniformare gli standard tecnico-scientifici nell'alimentazione.

In Europa invece vige il principio di precauzione.

Con il termine principio di precauzione si intende una politica di condotta cautelativa per quanto riguarda le decisioni politiche ed economiche sulla gestione delle questioni scientificamente controverse.

A seguito della Conferenza sull'Ambiente e lo Sviluppo delle Nazioni Unite (Earth Summit) di Rio de Janeiro del 1992, a cui hanno preso parte più di centottanta delegazioni governative da tutto il mondo, è stata ratificata la Dichiarazione di Rio, una serie di principi non impegnativi riguardanti le responsabilità ed i diritti degli Stati, per cercare di mettere insieme le esigenze dello sviluppo con quelle della salvaguardia ambientale.

Il principio di precauzione è stato definito dal punto 15 come segue (General Assembly 1992):

« Al fine di proteggere l'ambiente, un approccio cautelativo dovrebbe essere ampiamente utilizzato dagli Stati in funzione delle proprie capacità. In caso di rischio di danno grave o irreversibile, l'assenza di una piena certezza scientifica non deve costituire un motivo per differire l'adozione di misure adeguate ed effettive, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale ».

Con il tempo e nella pratica il campo di applicazione si è allargato dalla protezione dell'ambiente alla politica di tutela dei consumatori, alla salute umana, animale e vegetale.

Il Trattato di Maastricht (GU 1992) ha introdotto in Europa il principio di precauzione (poi ripreso dalla Costituzione Europea art. III-233) (GU 2004) attualmente enunciato all'art. 191 del Trattato sul funzionamento dell'Unione europea (Trattato di Lisbona 2009).

La sopracitata Comunicazione COM 1 (2000) della Commissione Europea esplicita i termini in cui il principio di precauzione deve essere adottato come approccio per prendere delle decisioni su specifiche materie.

Il principio di precauzione viene definito come una strategia di gestione del rischio nei casi in cui si evidenzino indicazioni di effetti negativi sull'ambiente o sulla salute degli esseri umani, degli animali e delle piante ma i dati disponibili non consentano una valutazione completa del rischio.

L'applicazione del principio di precauzione richiede tre elementi chiave:

l'identificazione dei potenziali rischi;

una valutazione scientifica, realizzata in modo rigoroso e completo sulla base di tutti i dati esistenti;

la mancanza di una certezza scientifica che permetta di escludere ragionevolmente la presenza dei rischi identificati.

Nel caso venga applicato il principio di precauzione, essendo stati identificati rischi per i quali non sia possibile avere una valutazione scientifica conclusiva, le misure adottate possono essere diverse. Tuttavia, tali misure devono rispettare determinati criteri, in particolare, essere proporzionali al livello di protezione ricercato ed essere prese a seguito dell'esame dei vantaggi e oneri derivati, anche in termini di una analisi economica costi/benefici. Inoltre tali misure possono essere mantenute finché i dati scientifici rimangono insufficienti, e sono da considerarsi provvisorie e sottoposte a modifica in funzione dei dati resi successivamente disponibili.

Nel campo della sicurezza alimentare, le attuali normative UE sono tra le più severe e rigide del mondo. Per garantire la sicurezza degli alimenti ai consumatori

e salvaguardare il settore agroalimentare da crisi ricorrenti, l'Unione Europea, e l'Italia come Paese membro, hanno adottato la strategia globale di intervento "sicurezza dai campi alla tavola" (EC 2004).

La qualità e la sicurezza degli alimenti dipendono infatti dagli sforzi di tutte le persone coinvolte nella complessa catena della produzione agricola, della lavorazione, del trasporto, della preparazione, della conservazione e del consumo di cibo. Per mantenere la qualità e la sicurezza degli alimenti lungo l'intera filiera alimentare sono necessari, da un lato, procedure operative per garantire la salubrità dei cibi e, dall'altro, sistemi di monitoraggio per garantire che le operazioni vengano effettuate correttamente.

Per questo L'UE fornisce una legislazione esaustiva e delinea le responsabilità di produttori e fornitori per contribuire a garantire la qualità e la sicurezza della catena alimentare.

In pratica i principi generali (Ministero della Salute 2004) sui quali verte la nuova legislazione comunitaria sono:

- controlli integrati lungo tutta la catena alimentare;
- interventi basati sull'Analisi del Rischio;
- responsabilità primaria dell'operatore del settore per ogni prodotto da lui realizzato, trasformato, importato, commercializzato o somministrato;
- rintracciabilità dei prodotti lungo la filiera;
- consumatore come parte attiva della sicurezza alimentare.

Oltre alla legislazione generale, valida per tutti i prodotti alimentari, in Italia sono in vigore norme specifiche riguardanti aspetti particolari della sicurezza degli alimenti quali, ad esempio, l'uso dei pesticidi, integratori alimentari, coloranti, residui di farmaci veterinari e contaminanti, addizione di vitamine, minerali e sostanze analoghe, materiali e prodotti a contatto con gli alimenti.

Per rendere più trasparente e scientifico il settore della regolamentazione alimentare (EUFIC 2006), alla fine degli anni '90 è stata avviata una revisione del quadro normativo UE. Nel 1997 è stato messo a punto un nuovo sistema di consulenza scientifica. Oltre al Comitato Direttivo Scientifico, sono state istituite otto nuove commissioni scientifiche. Nel 2002 è stata creata l'EFSA, European Food Safety Authority (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare), organismo indipendente che lavora in stretta collaborazione con vari enti e istituti scientifici degli stati Membri, offrendo una consulenza scientifica indipendente su tutte le questioni che influiscono direttamente o indirettamente sulla sicurezza alimentare.

L'organismo supervisiona tutte le fasi di produzione e di fornitura degli alimenti, dal settore primario fino alla distribuzione ai consumatori. L'EFSA si occupa anche dei rischi legati alla catena alimentare ed effettua una valutazione scientifica su qualsiasi tema che abbia effetti diretti o indiretti sulla sicurezza della fornitura alimentare, compresi i problemi correlati alla salute e al benessere degli animali e delle piante.

L'EFSA ha già formulato pareri scientifici su una vasta serie di questioni problematiche legate al rischio. Tra queste:

l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE);

la sicurezza degli additivi alimentari come l'aspartame;

gli ingredienti alimentari allergenici;

gli organismi geneticamente modificati (OGM);

i pesci da allevamento o selvatici;

i pesticidi;

le problematiche di sanità veterinaria come l'influenza aviaria.

Il 19 febbraio 2008 alla presenza dei Ministri della Salute e delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, si è insediato Il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA).

Il CNSA è l'organo tecnico-consultivo che agisce in stretta collaborazione con il Ministero della Salute e con l'EFSA in materia di sicurezza alimentare e formula pareri scientifici su richiesta del Comitato strategico di indirizzo, delle Amministrazioni centrali e delle Regioni e delle Province autonome di Trento e Bolzano.

Il CNSA ha finora emesso i pareri sui seguenti argomenti:

trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura del formaggio;
lisozima nel grana padano;
tenori massimi di melammina negli alimenti;
listeria *Monocytogenes* nei formaggi.

I rischi alimentari appartengono, a seconda della natura, a contaminazioni chimiche, biologiche e fisiche:

volontarie ed entro certi termini consentite (es. fitosanitari e livelli di soglia);
involontarie ed entro certi termini consentite (es. diossine in alimenti di origine animale, batteriche);
volontarie e non consentite (frodi alimentari, adulterazioni e sofisticazioni);
involontarie e non consentite (come i disastri ambientali che creano contaminazione lungo la catena alimentare, es. aflatossine in risposta al cambiamento climatico).

Così come definito nel Regolamento (CE) n. 178/2002 Art.3 par.9, il rischio è funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo.

1.1.1. Istituzioni che vigilano sulla sicurezza alimentare

In seguito ad una serie di scandali, avvenuti nell'ultimo ventennio (BSE, Diossina, Melammina, etc ...), che hanno compromesso la fiducia del consumatore nella catena alimentare, l'Unione Europea è arrivata alla conclusione che era necessario

creare un nuovo ente scientifico che avesse il compito di formulare proposte indipendenti ed oggettive in materia di sicurezza alimentare. Così come si legge nel Libro Bianco della Sicurezza Alimentare, tale Ente "...contribuirà ad ottenere un elevato livello di protezione per la salute del consumatore e, successivamente, a recuperare e preservare la sua fiducia". L'obiettivo è stato raggiunto con la creazione dell' Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA). L'EFSA fornisce consulenza scientifica su tutte le problematiche relazionate con la sicurezza degli alimenti e mangimi (inclusendo la salute ed il benessere animale e la protezione delle piante) e propone consulenza scientifica in materia di nutrizione in accordo con la legislazione comunitaria.

Il sistema sulla sicurezza alimentare degli Stati Uniti d' America è basato su leggi federali e statali forti e flessibili, su conoscenze scientifiche e su responsabilità legali dell' industria che deve produrre alimenti sicuri. Questo sistema guida i seguenti principi:

- si possono commercializzare solo alimenti sicuri e sani;
- le direttive emanate in materia di sicurezza alimentare hanno un supporto scientifico;
- il governo ha la responsabilità dell'entrata in vigore di tali direttive;
- i fabbricanti, distributori, importatori ed altri, sono responsabili della non osservanza delle direttive;
- il processo di regolamento è trasparente ed accessibile al pubblico.

Distinte Autorità sono implicate in questo sistema.

La Food and Drug Administration (FDA) è l'organismo responsabile del legiferare, negli Stati Uniti, nel campo di altri aspetti, sulle norme di etichettatura e confezionamento, così come sugli standard di qualità degli alimenti che si commercializzano in questo Paese. In questa legislazione si trova una sezione specifica sugli ingredienti alimentari e sull'imballaggio alimentare; in tale sezione, infatti, sono indicate le sostanze che possono essere usate nella produzione,

trattamento, confezionamento, trasporto, conservazione dell'alimento e si specifica anche la necessità che ciascuna di queste sostanze passi per un processo di accertamento di innocuità prima della sua commercializzazione.

Riguardo la situazione in Sud America, nel 1991 è stato creato il Mercado Comùn del Sur (MERCOSUR 2004), cui partecipano Argentina, Brasile, Paraguay ed Uruguay, quali Stati presidenti, e Bolivia e Cile, come Stati associati. L' Organo esecutivo del MERCOSUR è il Grupo Mercado Comun (GMC) che vanta tra le sue funzioni quelle di coordinare ed orientare i compiti dei differenti sottogruppi di lavoro.

Nel sottogruppo di lavoro 3 è stata creata la Comisión de Alimentos. I parametri fondamentali, attraverso cui questa Commissione lavora, sono:

concetti di salubrità, a partire dalla verifica di innocuità e di sicurezza alimentare;
trasparenza ed equivalenza, per fornire al consumatore tutte le informazioni necessarie;
assistenza pratica nelle truffe a carico del consumatore.

Tutto questo significa lavorare in maniera coordinata in due diversi ambiti, uno orizzontale, per garantire la sicurezza degli alimenti, ed uno verticale, a partire dall'elaborazione di regole verticali. In tutti i casi per l' armonizzazione della legislazione preesistente negli Stati membri si considera la normativa internazionale vigente, considerando il Codex Alimentarius il punto di riferimento nell' orientamento, e la si integra, soprattutto, con la Legislazione dell' Unione Europea e quella della Food and Drugs Administration (FDA) a seconda dei casi.

1.2 Materiali destinati al contatto con gli alimenti

Il cibo rappresenta la principale via di esposizione umana a sostanze xenobiotiche ed a metalli pesanti. Tipici contaminanti alimentari, come pesticidi, diossine, PCBs, PBDEs, metilmercurio, piombo, arsenico, etc. sono sostanze ampiamente studiate negli alimenti; al contrario, il ruolo degli imballaggi alimentari , come ulteriore fonte

di contaminazione, ha ricevuto molto meno attenzione, nonostante i materiali di imballaggio contribuiscano in maniera significativa all'assunzione umana di xenobi.

L'imballaggio alimentare può interagire con il cibo in esso contenuto attraverso un processo di diffusione controllato che dipende essenzialmente dalle proprietà chimiche dei materiali destinati ad entrarvi in contatto e dagli alimenti, dalla temperatura di impacchettamento, dalla durata del trattamento termico e conservazione, dall'esposizione ai raggi UV e dal tempo di conservazione del prodotto. Questa interazione può determinare il rilascio di componenti dall'imballaggio all'alimento, processo noto come "migrazione". I componenti che possono migrare dalle plastiche, o altri MCA, sono sostanze di partenza usate nell'iniziale step di polimerizzazione, come monomeri o catalizzatori, e additivi coinvolti durante il processo di manifattura per garantire al materiale speciali proprietà. Tali composti iniziali possono essere rilasciati per un incompleto processo di polimerizzazione o in seguito all'usura del materiale per un fenomeno di degradazione del polimero. Inoltre, sia sostanze di partenza che additivi possono contenere impurità, le quali anche potrebbero migrare da materiale all'alimento. Questi composti sono noti come "sostanze non addizionate intenzionalmente" (NIAS, non intentionally added substances) ed includono anche prodotti collaterali derivanti dalla complessa reazione di polimerizzazione, quali oligomeri, ad esempio un trimero di stirene dal polistirene, o prodotti di rottura del composto iniziale, come il nonilfenolo derivante dall'idrolisi dell'additivo trisnonilfenil fosfito (TNPP).

E' ben noto come molti di tali composti che rientrano nella produzione delle plastiche, sia come intenzionali che non intenzionali mostrino attività di distruttori endocrini in sistemi biologici. Pertanto, è importante considerare come i materiali a contatto con gli alimenti siano un'importante fonte di assunzione umana a sostanze ad attività endocrina (EDCs, Endocrine Disrupting Chemicals) per rilascio dal MCA nell'alimento per contaminazione dai contenitori.

Sono definiti "materiali a contatto" (MCA) quei materiali e oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti (utensili da cucina e da tavola quali pentole, posate, piatti e bicchieri, i recipienti e contenitori, le pellicole-fogli, imballaggi, colle e inchiostri per l'etichettatura, etc). Con tale termine si indicano anche i materiali ed oggetti che sono in contatto con l'acqua, ad esclusione degli impianti fissi pubblici o privati di approvvigionamento idrico. Nonostante questa definizione non includa solo i contenitori alimentari, sono quest'ultimi che rivestono una maggiore rilevanza, dovuta al loro uso tanto esteso. Attualmente, gli alimenti si presentano in vari contenitori, prodotti a partire da differenti materie prime. Ciò fa sì che l'area degli imballaggi alimentari sia un campo piuttosto esteso che ingloba differenti discipline, quali possono essere la chimica, la microbiologia, la scienza e la tecnologia degli alimenti e l'ingegneria.

Nella società attuale, l'imballaggio è fondamentale ed essenziale: avvolge, mette in risalto e protegge gli articoli che compriamo, dal processamento e dalla manifattura, passando per il confezionamento e la conservazione, fino al consumo finale. Senza la confezione, i moderni canali di vendita sarebbero quasi impossibili. Considerando l'importanza ed il ruolo cruciale che riveste l'imballaggio, quest'ultimo è a volte considerato come un male necessario o come una spesa non essenziale. Molti consumatori lo ritengono un qualcosa di superfluo ed a volte, nel peggiore dei casi, come uno spreco di risorse ed una minaccia per l'ambiente. E' ovvio che tale opinione nasce dal fatto che non tutti conoscono o tengono in debita considerazione la funzione a cui il contenitore assolve. Quando la maggior parte dei consumatori entra in contatto con l'imballaggio, la funzione dello stesso è terminata ed è forse comprensibile il perché non venga valorizzato il suo compito (Robertson 1993).

Tra le funzioni a cui assolve l'imballaggio, oltre quelle di marketing, si ricordano quella di contenere il prodotto, funzione essenziale, e di preservare la qualità dello stesso. In particolare, lo scopo è quello di preservare il cibo, proteggendolo da (i)

aria (e dall'ossigeno, in particolare), (ii) perdita di gas (le bibite gassate), (iii) umidità, (iv) luce (e radiazioni UV), (v) composti estranei, (vi) influenze meccaniche. Tuttavia, c'è una caratteristica molto importante, e che si deve esigere da tutti i contenitori, che è quella che non ci siano interazioni tra il contenitore e l'alimento. Le moderne tecniche di imballaggio, con l'utilizzo di nuovi materiali, hanno risolto molti problemi, in particolare quelli legati all'igienicità, ma hanno introdotto il problema della migrazione di sostanze che talvolta possono essere tossiche.

1.2.1 Carta e cartone

La carta ed il cartone sono alcuni dei materiali di imballaggio più antichi e versatili disponibili oggi sul mercato. E' un materiale paradossale perché può essere costante o effimero, fragile o resistente, economico o costoso, abbondante o scarso.

Questi due materiali, da soli o in combinazione con altri, sono stati usati come imballaggi alimentari per molto tempo. Entrambi sono prodotti a partire da fibre di cellulosa, ottenuta da alberi. Chimicamente, la cellulosa pure consiste di lunghe catene costituite da β -glucosio di peso molecolare variabile. La cellulosa ha una struttura lineare o fibrosa, attraverso cui si stabiliscono numerosi ponti ad idrogeno tra i gruppi ossidrilici delle diverse catene giustapposte di glucosio, rendendo la rete così creata impenetrabile all'acqua e creando fibre compatte che costituiscono la parete delle cellule vegetali. Queste fibre si raggruppano tra di loro e questo dà vita alle fibre di carta. In generale si chiama cartone quando la densità è maggiore di 224 g/m^2 (ILSI 2004).

La carta ed il cartone si possono utilizzare come materiali destinati a venire in contatto con gli alimenti in maniera molto diversa, tanto direttamente che indirettamente, laminati, ad esempio, con altri materiali come plastica o fogli di alluminio.

Tra i vari tipi che oggi si usano come imballaggi alimentari ci sono:

Contenitori di carta: naturale o bianco, ricoperto o associato con altri materiali, si trova in forma di busta.

Contenitori di cartone: si possono trovare come scatole per prodotti di pasticceria o come recipienti. E' il contenitore più utilizzato per prodotti come pasti congelati o come recipiente per alimenti liquidi.

Cartone ondulato: marrone o bianco, resistente all'umidità ed alla compressione. Questi contenitori costituiscono il maggior volume di carta e cartone usato per applicazioni destinate a venire in contatto con gli alimenti.

Negli ultimi 50 anni si è avuto un significativo aumento nell'uso di questi materiali, per vari motivi: è solido ed adattabile, è pratico, si ricicla facilmente ed è fatto di materiale rinnovabile (ILSI 2004).

1.2.2 Materiale plastico

I materiali plastici sono composti macromolecolari organici ottenuti per polimerizzazione, policondensazione, poliaddizione o secondo altri processi simili, a partire da molecole con peso molecolare inferiore, o per modificazione chimica di macromolecole naturali. Durante la loro produzione vengono coinvolti monomeri di partenza così come altri composti normalmente di basso peso molecolare che si aggiungono intenzionalmente come coadiuvanti del processo di fabbricazione o come modificatori delle caratteristiche del prodotto finale; sono "additivi" destinati ad assolvere a determinati effetti tecnici (plastificanti, antiossidanti, coloranti...).

Secondo le caratteristiche termodinamiche, i materiali plastici si possono classificare (Sarria Vidal 1999):

Termoplastici:

Poliolefine: come il polietilene (PE), l'etilene/acetato di vinile (E/VA), l'etilen/alcol vinilico (E/AL o VEO), il polipropilene (PP), il polibutene (PB) ed il polimetilpentene (PMP).

Plastiche polistireniche: come il polistirene (PS), lo stirene/acrilonitrile (SAN), stirene/butadiene (SB) o PS di alto impatto (HIPS) ed il acrilonitrile/butadiene/stirene (ABS).

Plastiche colorate: come il policloruro di vinile rigido (PVC) ed il policloruro di vinilidene (PVDC).

Plastiche fluorurate: come il polifluoretilene o teflón (PTFE).

Plastiche tipo esteri: come il polietereftalato de etilene (PET) ed il policarbonato (PC).

Plastiche con gruppi azotati (poliamide) come le poliamidi alifatiche semicristalline (PA), le poliamidi semiaromatiche cicliche o il poliacrilonitrile (PAN).

Plastiche temostabili:

Plastiche fenoliche (PF).

Aminoplastiche.

Resine Poliesteree.

Resine epossidiche.

Elastomeri

Plastiche di alta prestazione

I materiali di ricopertura sono plastiche che bilanciano una protezione necessaria e supplementaria al materiale di base ed al prodotto. Questi materiali di copertura si applicano su una superficie costituendo una pellicola sottile e continua, con lo scopo di aumentare l'inerzia imballaggio-alimento. Nella maggior parte dei casi, la copertura si applica direttamente sopra una latta o altro materiale base prima della formazione del contenitore. La copertura interna delle latte è molto importante perché previene la reazione tra il metallo della latta ed i componenti dell'alimento confezionato. L'esterno della latta è verniciato sia per ragioni decorative sia per prevenire la corrosione.

1.2.3 Altri

Il vetro è un materiale duro, fragile e trasparente. Nonostante il suo comportamento da solido, questo è un liquido sovraraffreddato ed amorfo (senza struttura cristallina). I recipienti di vetro si conoscono già dalla più remota antichità e si sono diffusi durante l'epoca romana, quando divennero abituali le tecniche di soffiare con la canna, anche se l'uso di tali recipienti come contenitori, che garantiscono la conservazione degli alimenti e delle bevande per lunghi tempi facilitandone il trasporto, è molto più recente. Gli imballaggi di prima fabbricazione (quelli che si ottengono per conformazione del vetro fuso, la cui composizione di base è silicato di sodio e calcio) sono i più comunemente usati sia per gli alimenti che per le bibite.

L'uso delle ceramiche smaltate come contenitori per conservare alimenti e bibite è piuttosto raro, nonostante cresca di giorno in giorno; è molto più comune, al contrario, il suo uso come stoviglia per cucinare e servire pietanze, come recipiente per il consumo rapido di pietanze e per attrezzature di diverso tipo. A differenza dei recipienti di vetro, la composizione chimica degli smalti utilizzati è molto variabile e si utilizzano diverse tecniche per la loro produzione (Català and Gavara 2002).

1.3. Normativa in materia di “materiali a contatto con gli alimenti”

Il contatto che avviene tra il contenitore e l'alimento suggerisce che si possa avere trasferimento di componenti, usati nel processo di fabbricazione dei recipienti, dal contenitore agli alimenti stessi. Al fine di garantire che questo fenomeno non rechi danno alla salute del consumatore, i materiali destinati ad entrare in contatto con gli alimenti sono sottoposti ad indagini e regolamentazioni specifiche (EC 2002).

1.3.1 La legislazione europea

I materiali e oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti sono disciplinati sia da provvedimenti nazionali che comunitari. Per quanto riguarda la disciplina comunitaria è attualmente in vigore il Regolamento (CE) N° 1935/2004 “Regolamento quadro” (EC 2004) che stabilisce i requisiti generali cui devono rispondere tutti i materiali ed oggetti in questione, mentre direttive specifiche contengono disposizioni dettagliate per i singoli materiali (materie plastiche, ceramiche etc). Il “Regolamento quadro” introduce, inoltre, disposizioni specifiche sugli imballaggi «attivi» e «intelligenti» che prolungano la durata di un alimento o che reagiscono quando l'alimento è degradato (con un imballaggio che cambia colore, ad esempio). Tale regolamento mira ad assicurare un elevato livello di tutela della salute umana e degli interessi dei consumatori per quanto attiene all'immissione sul mercato comunitario dei materiali e degli oggetti destinati a venire a contatto, direttamente o indirettamente, con i prodotti alimentari.

In particolare, stabilisce che tutti i materiali ed oggetti devono essere prodotti conformemente alle buone pratiche di fabbricazione e, in condizioni d'impiego normale o prevedibile, non devono trasferire agli alimenti componenti in quantità tale da:

costituire un pericolo per la salute umana

comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari

comportare un deterioramento delle caratteristiche organolettiche.

L'allegato I del "Regolamento quadro" identifica 17 gruppi di materiali e oggetti per i quali possono essere adottate misure specifiche:

i materiali e oggetti attivi o intelligenti; le colle;

le ceramiche; il sughero;

il caucciù; il vetro ;

le resine scambiatrici di ioni;	i metalli e le leghe; la carta e il cartone;
i materiali plastici;	gli inchiostri di stampa;
le cellulose rigenerati;	i siliconi;
i tessili;	le vernici e i rivestimenti;
le cere;	il legno.

Tali misure specifiche possono includere:

un elenco delle sostanze autorizzate per essere impiegate nella fabbricazione di materiali e oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari;

i requisiti di purezza;

le condizioni particolari d'impiego;

i limiti di cessione di taluni componenti nei o sui prodotti alimentari;

le disposizioni miranti a proteggere la salute umana o a garantire l'osservanza dei requisiti applicabili ai materiali e agli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari;

le norme fondamentali per il controllo dell'osservanza delle disposizioni di cui sopra;

le norme riguardanti il prelievo dei campioni;

le disposizioni volte a garantire la rintracciabilità;

disposizioni aggiuntive in materia di etichettatura per i materiali e gli oggetti attivi o intelligenti;

disposizioni che prevedano l'istituzione di un registro comunitario delle sostanze, dei procedimenti, dei materiali e degli oggetti autorizzati;

le norme procedurali specifiche per l'autorizzazione di una sostanza, di un procedimento, di un materiale o di un oggetto.

Per i materiali a contatto con gli alimenti realizzati in plastica la direttiva 2002/72/CE (EC 2002) della Commissione Europea del 6 agosto 2002 stabilisce un limite di migrazione globale di 60 mg/Kg di prodotto alimentare o 10 mg/dm² di superficie di contatto. Per le singole sostanze autorizzate al contatto con l'alimento possono essere definiti i limiti di migrazione specifica (SML). I monomeri con i relativi limiti di migrazione sono inventariati in una "lista positiva" (allegato II, sezione A, 2002/72CE) che può essere aggiornata sulla base di nuove conoscenze. La stessa cosa è stata fatta per gli additivi riportati in una lista analoga (allegato II, sezione B, 2002/72CE).

1.3.1.1 Autorizzazione delle sostanze

Le richieste di autorizzazione di una nuova sostanza per la fabbricazione di materiali o oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari vengono sottoposte all'autorità competente dello Stato membro in cui sarà commercializzata la sostanza. Le richieste sono in seguito trasmesse all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, la quale ha il compito di valutare la tossicità delle sostanze per evitare eventuali rischi per il consumatore.

1.3.1.2 Rintracciabilità

Il regolamento specifica inoltre i requisiti di rintracciabilità dei materiali a contatto con i prodotti alimentari, dalla produzione sino alla commercializzazione.

L'etichettatura o la documentazione che accompagna i materiali e gli oggetti immessi sul mercato comunitario deve garantire la rintracciabilità di tali materiali e oggetti. La rintracciabilità facilita il controllo, il ritiro dei prodotti difettosi, le informazioni ai consumatori e l'attribuzione delle responsabilità.

1.3.1.3 Etichettatura

La natura dei materiali e degli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari deve essere indicata nella rispettiva etichettatura. I materiali e gli oggetti non ancora entrati in contatto con il prodotto alimentare al momento dell'immissione sul mercato, ma destinati, comunque, ad essere contenitori o imballaggi di prodotti alimentari, devono recare la dicitura «Per contatto con i prodotti alimentari» o il simbolo riprodotto nell'allegato II e riportato nella seguente figura (il simbolo raffigura un bicchiere e una forchetta) (EC 2004).



Per quanto riguarda i provvedimenti comunitari occorre evidenziare che negli ultimi anni la Commissione Europea ha utilizzato preferibilmente lo strumento dei regolamenti anziché delle direttive, in quanto i regolamenti sono direttamente applicabili in tutto il territorio dell'Unione Europea a partire dalla data della loro entrata in vigore. A tal proposito, di rilevante importanza è anche il Regolamento 2023/06/CE "Regolamento GMP" (Good Manufacturing Practices). Tale regolamento si applica a tutti i settori e a tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione di MCA e stabilisce le norme relative alle buone pratiche di fabbricazione.

1.3.2 La legislazione statunitense

Negli Stati Uniti d'America, i materiali per il confezionamento degli alimenti si classificano generalmente come additivi alimentari (vale a dire le sostanze che sono intenzionalmente aggiunte agli alimenti), giacchè possono passare ad essere componenti degli alimenti per mezzo di un normale processo di diffusione.

Gli additivi alimentari sono soggetti ad una valutazione della loro innocuità previa commercializzazione. Esistono processi di petizione e di notifica (che si applicano strettamente agli additivi che sono in contatto con gli alimenti, includendo gli imballaggi) dettate dalla legislazione per servire da mezzo per la valutazione dell'innocuità da parte della FDA.

La "Politica di soglia della Regolamentazione" permette l'esenzione dalla necessità di sviluppare una regolamentazione specifica per una sostanza, affinché possa essere utilizzata per il contatto con gli alimenti, quando l'esposizione giornaliera stimata nella dieta del consumatore, riguardo all'uso previsto di questa sostanza, è al di sotto del valore di soglia.

La "Politica dei Costituenti" si applica alle impurezze cancerogene che accompagnano gli additivi alimentari, che non sono considerati cancerogeni di per sé. Sebbene le leggi degli Stati Uniti proibiscano che qualsiasi sostanza considerata cancerogena, sia per uso umano che animale, si approvi come additivo alimentare, le impurezze cancerogene si possono stimare mediante un procedimento di valutazione quantitativa di rischio, sempre che l'additivo non sia cancerogeno.

1.3.3 La legislazione nel MERCOSUR

Rispettando il concetto di attitudine sanitaria, per la fabbricazione di imballaggi o di attrezzature alimentari, si permette solo l'uso di sostanze che sono elencate nelle cosiddette liste positive. Queste sostanze sono sia materie prime che additivi che altri componenti minori. Nelle liste positive possono specificarsi restrizioni riguardo

l'uso di certi componenti usati nella produzione degli imballaggi alimentari. Queste restrizioni possono adottare una forma di limite di composizione, limite di migrazione specifica, proibizioni nell'uso di determinate sostanze per il contatto con un tipo di alimento, o autorizzazione nell'usare determinate sostanze solo in alcuni materiali da imballaggio. Altro fattore da tenere in considerazione è il limite di migrazione totale o globale, per il quale si effettuano saggi di cessione attraverso i quali si quantificano la quota totale di componenti che si trasferiscono dall'imballaggio al simulante alimentare.

Infine, si stabilisce che i materiali di imballaggio non devono modificare le caratteristiche sensoriali del prodotto contenuto.

Bibliografia:

Catalá R, Gavara R (2002) Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. Ed. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia

EUFIC (European Food International Council) (2004) [<http://www.eufic.org/gb/home/home.htm>].

EUFIC (European Food International Council) (2006) Fondamenti 06/2006. "La sicurezza alimentare". Consultabile su www.eufic.org

EC (2002) Direttiva 2002/72/CE della commissione del 6 agosto 2002 relativa ai materiali e agli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee

EC (2004) Regolamento (CE) N. 1935/2004 Del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea

General Assembly (1992) 12/08/1992. A/CONF. 151/26 (Vol.I). "Rio declaration on environment and development".

GU (Gazzetta Ufficiale) (2004) C310/55 (parte III-233) del 16/12/2004. "Trattato che adotta una costituzione per l'Europa".

GU (Gazzetta Ufficiale) (1992) C191 del 29/07/1992. "Trattato sull'unione europea".

MERCOSUR (2004) [<http://www.mrecic.gov.ar/comercio/mercosur/subgrupos.html>]

Ministero della Salute (2004) Regolamento n.882/2004. "L'Italia e la strategia europea per la sicurezza alimentare". Consultabile su www.salute.gov.it

Robertson, G. L.; (1993). Food Packaging, Principles and Practice. Ed. MarcelDekker, Inc., New York. USA

Sarria Vidal, M (1999). Evaluación de la aptitud de envases para alimentos en función del estudio de interacciones envase-alimento. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo

Trattato di Lisbona (2009) del 1/12/2009

Capitolo 2

2.1 I distruttori endocrini

L'esposizione a sostanze chimiche durante le normali attività quotidiane, nell'ambiente di vita, di lavoro e attraverso gli alimenti ha un posto di rilievo fra i fattori di rischio per la salute. Negli ultimi anni la Commissione Europea e altri organismi internazionali (OECD, WHO) hanno indicato in particolare come prioritario l'incremento delle conoscenze sugli "Endocrine Disrupting Chemicals" (EDC), un eterogeneo gruppo di sostanze caratterizzate dalla capacità potenziale di interferire, attraverso svariati meccanismi, con il funzionamento del sistema endocrino, in particolar modo con l'omeostasi degli ormoni sessuali e della tiroide.

L'U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ha definito i distruttori endocrini come "agenti esogeni che interferiscono con la produzione, rilascio, trasporto, metabolismo, legame, azione ed eliminazione degli ormoni naturali, essenziali per il mantenimento dell'omeostasi e per la regolazione dei processi alla base del normale sviluppo dell'organismo umano" (Kavlock et al. 1996). La fase di crescita dell'organismo più sensibile all'azione dei distruttori endocrini (DE) è sicuramente quella riproduttiva, che va dalla produzione dei gameti fino allo sviluppo intrauterino e post-natale della progenie. L'organismo in via di sviluppo può ritrovarsi esposto a dosi di sostanze tossiche che, innocue per l'adulto, possono risultare molto dannose in considerazione delle sue piccole dimensioni. Possono considerarsi potenziali bersagli dei DE tutti quei tessuti e organi in cui sono presenti recettori specifici per gli ormoni steroidei e tiroidei, tra cui anche il tessuto scheletrico, il sistema cardiovascolare e il sistema nervoso centrale (SNC). Gli effetti indesiderati finora osservati, mediante studi *in vivo* e *in vitro*, sono la compromissione della capacità riproduttiva, la presenza di difetti morfologici o funzionali alla nascita, lo sviluppo di patologie tumorali e alterazioni del sistema immunitario (Birnbaum and Fenton 2003). Queste osservazioni hanno contribuito a diffondere la preoccupazione per l'aumento del numero di sostanze di uso comune, prodotte

dall'uomo, in grado di mimare l'effetto degli ormoni sessuali e di provocare alterazioni del sistema endocrino degli animali, incluso l'uomo (Menditto et al. 1997).

2.1.1 Classificazione dei distruttori endocrini

L'enorme quantità di composti che potrebbero interferire con il sistema endocrino umano o animale non ne facilita la classificazione. In via generale si possono classificare questi composti in cinque categorie principali:

a) farmaci o estrogeni sintetici (come il 17β -estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo, DES).

b) fitoestrogeni tra cui:

- isoflavoni (genisteina e daidzeina della soia);
- cumestani (cumestrolo);
- lignani (secoisolariciresinolo e matairesinolo);
- stilbeni (resveratrolo dell'uva).

c) pesticidi a loro volta distinguibili in:

- organofosforici;
- carbammati;
- ditiocarbammati;
- organoclorurati;
- erbicidi del gruppo ammonio quaternario.

d) plastificanti (in particolare ftalati) e prodotti derivati dalla combustione del PVC (policloruro di vinile), ma anche della carta e delle sostanze putrescibili come le diossine.

e) sostanze di origine industriale come:

- fenoli;
- ritardanti di fiamma;
- acido perfluorooctanico e suoi sali;
- metalli pesanti come piombo, cadmio, mercurio.

f) alchilfenoli caratterizzati da un gruppo fenolico cui sono legati uno o più gruppi alchilici R; esistono sia come composti naturali sia come prodotti artificiali o di sintesi.

nonilfenolo;

octilfenolo ;

bisfenoli;

Sono stati dimostrati effetti estrogeno-simili (sia *in vivo* che *in vitro*) anche per alcune sostanze naturali (incluse alcune micotossine), potenzialmente presenti in alcuni componenti della dieta (Jobling et al. 1995).

I distruttori endocrini hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare, di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e di accumularsi a livello del tessuto adiposo. Il loro bioaccumulo ha sicuramente una notevole importanza dal punto di vista tossicologico, anche se bisogna considerare che tale fenomeno non è riconducibile solo all'inquinamento ambientale ma può verificarsi anche attraverso la via alimentare (Baldi and Mantovani 2008).

Contemporaneamente al riconoscimento della capacità dei DE di interferire con un'ampia gamma di processi durante lo sviluppo negli animali, alcuni studi epidemiologici sull'uomo hanno rilevato un aumento, negli ultimi anni, di alcuni disordini e patologie umane, correlabile in alcuni casi all'esposizione ai DE. Questi

disordini includono: l'aumento delle pubertà precoci, della poliabortività e dei parti pre-termine, l'obesità, disfunzioni cognitive e malformazioni dell'apparato riproduttivo (criptorchidismo e ipospadia), una diminuita funzionalità del sistema riproduttivo (la riduzione della produzione spermatica, l'aumento delle cisti ovariche e dell'endometriosi) e del sistema immunitario, patologie tiroidee e alcuni tipi di neoplasie (cancro alla prostata, carcinoma della mammella e della vagina). I meccanismi biologici delle suddette patologie suggeriscono che possano esservi coinvolti segnali intra e intercellulari. Dobbiamo evidenziare che, durante il ciclo vitale di un organismo, esistono particolari fasi dello sviluppo, quali quella embrionale e/o neonatale in cui è maggiore la vulnerabilità alle interferenze ormonali. Ciò dipende da diversi fattori, inclusa l'assenza di sistemi enzimatici protettivi pienamente sviluppati e l'elevato metabolismo durante lo sviluppo embrionale. Il punto essenziale è, tuttavia, che gli eventi coinvolti nello sviluppo implicano una serie di scelte organizzative, che una volta compiute, sono irreversibili. Nei mammiferi le madri possono trasmettere i contaminanti alla prole tramite placenta o, dopo la nascita, allattando i neonati. Anche se gli individui adulti esposti a un determinato composto ad una particolare dose possono non evidenziare effetti nocivi, la loro prole può invece mostrare alterazioni riproduttive, comportamentali, neurali e immunitarie per tutta la vita (Calamandrei et al. 2009).

2.2 Bisfenoli come interferenti endocrini (EDC)

2.2.1. Chimica dei bisfenoli

I bisfenoli tutti sono caratterizzati da una struttura di base costituita da due anelli di tipo fenolico legati insieme da un atomo di carbonio che può essere diversamente sostituito. I due fenoli possono essere ulteriormente funzionalizzati ed i gruppi ossidrilici sono impiegati nella formazione del legame tra le numerose unità monomeriche o essere diversamente sostituiti come nel caso dei diglicidil eteri.

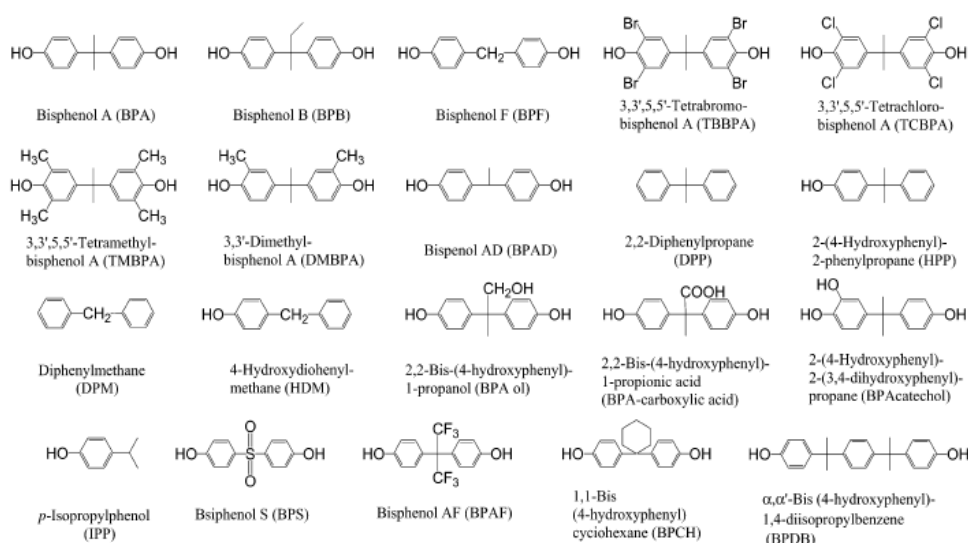


Figura 1. BPA e suoi congeneri strutturali

La sintesi del Bisfenolo A è attribuita al chimico Danin e risale al 1891.

Successivamente, nel 1936, durante alcuni esperimenti condotti su ratti ovariectomizzati, Dodds e Lawson notarono che tale molecola possedeva attività simil-estrogenica (Dodds and Lawson 1938).

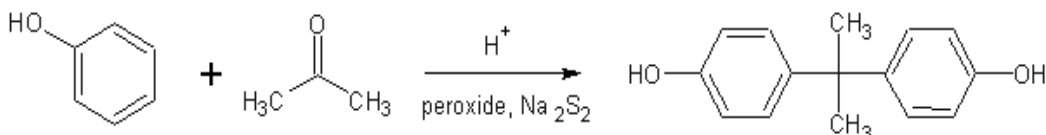


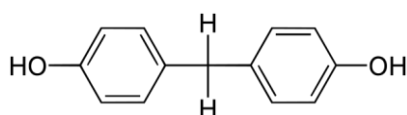
Figura 2. Sintesi del BPA a livello industriale

La molecola di Bisfenolo A (2,2-bis[4'idrossifenol] propano) possiede un peso molecolare pari a 228,3 e viene ottenuto per sintesi catalitica da 2 moli di fenolo ed 1 di acetone, su resine a scambio ionico con conseguente formazione di acqua.

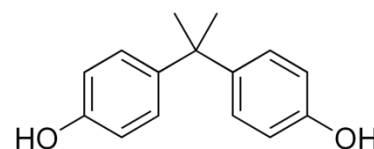
Come descritto nelle schede internazionali di sicurezza chimica, il Bisfenolo A si presenta sottoforma di cristalli bianchi, o sottoforma di polvere o come granulato e viene assorbito dall'organismo per ingestione o per inalazione.

A partire dal bisfenolo A (BPA) sono stati sintetizzati i congeneri strutturali.

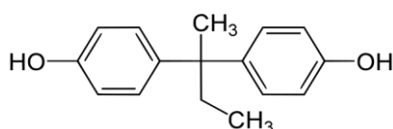
Eccone alcuni esempi:



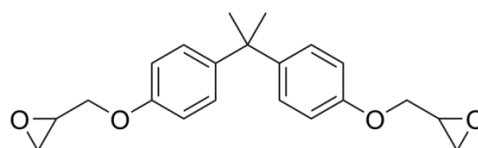
Bisfenolo F



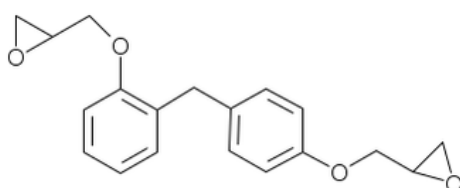
Bisfenolo A



Bisfenolo B



BADGE



BFDGE

Figura 3. Esempi di bisfenoli

2.2.2. Meccanismo d'azione

I bisfenoli pur non essendo degli steroidi sono molecole che presentano analogie strutturali con l'estradiolo il che li rende in grado di interferire proprio con l'attività degli estrogeni endogeni in diversi tessuti bersaglio. È stato dimostrato che il BPA può esercitare alcuni tra i suoi effetti andandosi a legare ai recettori steroidei nucleari ER α e ER β e modificando, così, l'espressione di geni regolati dagli estrogeni (Wetherill et al. 2007); questo effetto genomico può manifestarsi fenotipicamente con un aumento della proliferazione cellulare. Studi sulle relazioni struttura-attività, dei bisfenoli, utilizzando come ligando recettoriale l'estrogeno endogeno, estradiolo, hanno permesso di definire le caratteristiche strutturali indispensabili per l'attività estrogenica. I minimi requisiti strutturali per tale attività del BPA e dei suoi congeneri strutturali sembrano essere il gruppo ossidrilico in posizione 4 dell'anello fenilico A e una porzione idrofobica nella catena di congiunzione dei due anelli; è stato anche dimostrato che le molecole con il gruppo ossidrilico in posizione 2 o 3 dell'anello fenilico presentano attività estrogenica con il seguente ordine: 4OH > 3OH > 2OH (Kitamura et al. 2005; Kitamura et al. 2003). Sostituzioni nelle posizioni 3 e 5 dell'anello fenilico e sulla porzione a ponte tra i due anelli influenzano marcatamente l'attività estrogenica. In particolare tramite analisi cristallografica è stato osservato che mentre per l'estradiolo il gruppo ossidrilico 3 interagisce con il Glu 353 e l'Arg 394 e il gruppo ossidrilico 17 β interagisce con l'His 524 del sito di legame del recettore estrogeno α , attraverso la formazione di legami ad idrogeno, per il BPA sembra essere il gruppo ossidrilico 4 ad interagire con gli stessi aminoacidi. Inoltre la catena lipofila a ponte tra i due anelli e l'anello fenilico B interagiscono strettamente con la porzione idrofobica del sito di legame del recettore suddetto; pertanto l'introduzione di sostituenti idrofili sulla catena induce una marcata riduzione dell'attività estrogenica a causa di una diminuzione della stabilità di legame con la porzione idrofobia recettoriale (Takahashi and Oishi 2000).

L'attività estrogenica è ridotta dalla trasformazione dei bisfenoli in metaboliti ossidati o coniugati con acido glucuronico o con solfato al gruppo ossidrilico 4 (Elsby et al. 2001).

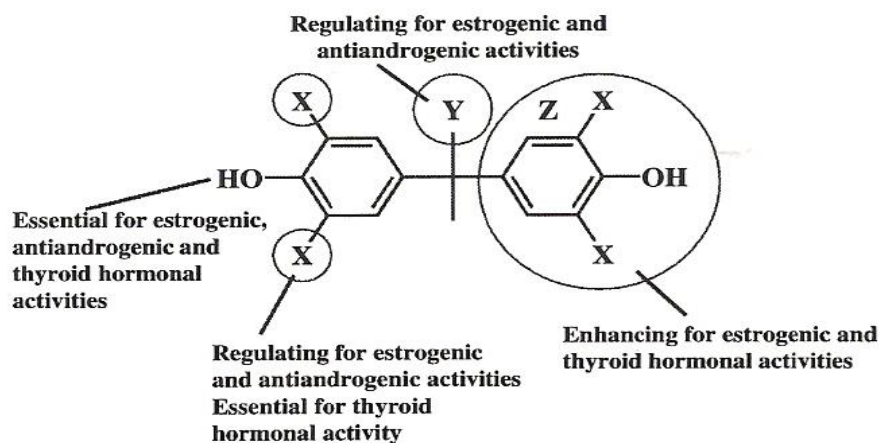


Fig 4. Requisiti strutturali necessari per l'attività endocrino distruttrice del bisfenolo A e di composti correlati

L' affinità di legame del BPA per il recettore degli estrogeni è dalle 10.000 alle 100.000 volte più debole rispetto a quella dell'estradiolo; per tale motivo il BPA è stato considerato un debole estrogeno ambientale. Tuttavia, risultati di numerosi studi sul meccanismo d'azione del BPA hanno mostrato una grande varietà di pathways attraverso cui tale sostanza sia in grado di stimolare risposte cellulari a concentrazioni molto basse che si sommano agli effetti iniziali tramite il legame con il classico recettore estrogenico nucleare. Infatti il BPA può agire indirettamente, tramite un pathway non genomico.

Le cellule di diversi tessuti presentano una isoforma recettoriale, associata alla membrana plasmatica, (GPR30) (Vandenberg et al 2008) in grado di legare piccole concentrazioni di BPA; tale recettore è un recettore accoppiato ad una proteina G, che consente la trasmissione del segnale all'interno della cellula tramite la formazione di un secondo messaggero che amplifica e rafforza la risposta. Questo recettore può essere attivato sia dagli estrogeni che dal BPA, a concentrazioni

picomolari e nanomolari. La fase finale del segnale a cascata è rappresentata dall'attivazione di fattori trascrizionali quali CREB e Rb, quest' ultimo, in particolare, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare (Bouskine et al. 2009) (Figura 5).

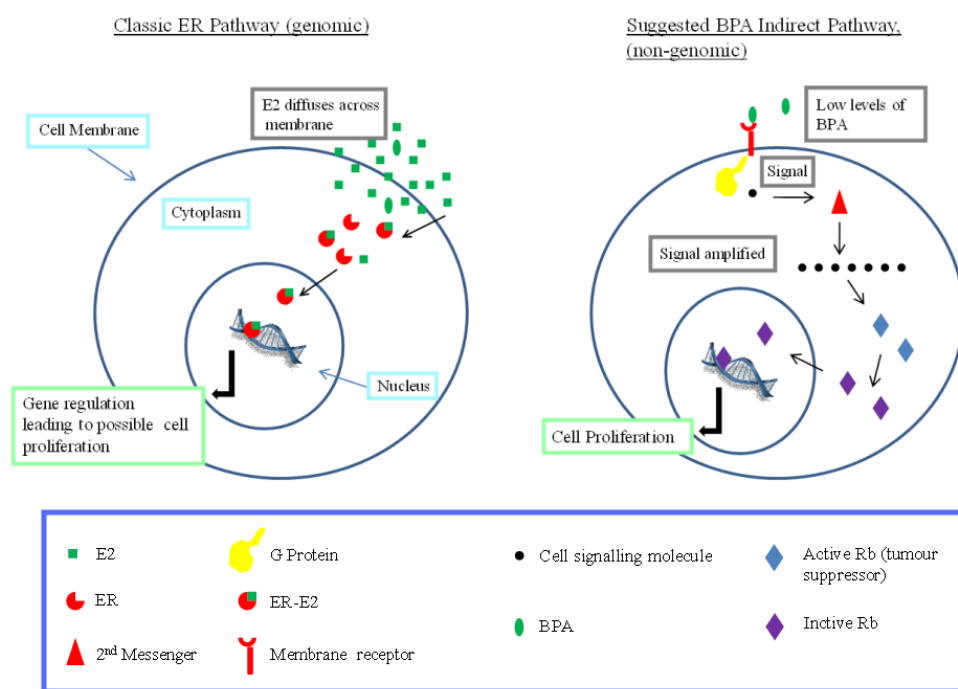


Figura 5. Diagramma che mostra come il BPA può influenzare indirettamente la proliferazione cellulare

Diversi studi hanno rivelato che il BPA possiede anche, una forte attività anti androgenica. Utilizzando saggi basati sulla competizione, è stato dimostrato che il BPA compete con il 5 α -diidrotestosterone (DHT) per il legame al recettore androgenico con un valore di IC₅₀ (concentrazione di sostanza richiesta per ridurre il legame del DHT del 50 %) di 2,14 μ M (Lee et al. 23; Wetherill et al. 2007). Inoltre, uno studio sulle cellule di Leydig ha dimostrato che basse dosi di BPA (0,01 nM) riducono la biosintesi di testosterone del 25%, come risultato di una ridotta espressione dell'enzima steroidogenico 17 α monossigenasi. L'esposizione post natale al BPA riduce i livelli sierici di 17 β estradiolo nei ratti, inibendo l'attività dell'aromatasi, riduce i livelli di mRNA per LH e aumenta l'espressione di ER β nell'ipofisi. Nelle cellule di Sertoli, fondamentali per la spermatogenesi, il BPA

agisce, invece, sulle giunzioni intercellulari, riducendole o alterandone la localizzazione. Tutto ciò spiega come il BPA sia in grado di agire negativamente anche sulla fertilità maschile (Fiorini et al. 2004).

2.2.3. Metabolismo del BPA

Poco si conosce circa l'attivazione metabolica, o inattivazione di xenoestrogeni. Presumibilmente, il loro metabolismo segue pathways simili a quelli del 17 β estradiolo. Le ossidazioni dell'estradiolo nelle posizioni C-2 e C-4 danno origine ai 2-3 e 3-4 catecoli i quali, anche possiedono attività estrogenica seppur ridotta. Diversi citocromi P450 (CYP) sia epatici ed extraepatici, sono coinvolti nel metabolismo degli estrogeni inclusi il CYP1A1, 1A2, 3A3, 3A4, 3A5 e 2C11. Recentemente, CYP1B1, un nuovo membro della famiglia del CYP1, poco espresso nel fegato ma abbondante nell'utero e nel tessuto mammario, è risultato coinvolto nella catalisi della 4-idrossilazione del 17 β estradiolo. I polimorfismi nei citocromi (CYP) sono molto comuni tra le varie popolazioni ed influenzano la loro capacità di detossificare farmaci e inquinanti. La conversione del BPA in un metabolita idrossilato e la trasformazione nella forma semichinonica e in quella chinonica è estremamente importante in quanto i chinoni sono molecole reattive che possono legare covalentemente sia il DNA, formando addotti sia in vivo che in vitro, sia proteine nucleari quali la DNA e RNA polimerasi, interferendo con i normali processi di duplicazione e trascrizione. La formazione di addotti al DNA nei tessuti riproduttivi, durante l'organogenesi, può indurre instabilità genetica, mutazioni e aberrazioni. È stato dimostrato anche che il BPA è in grado di interferire con l'assemblaggio dei microtubuli provocando aneuploidie e aberrazioni cromosomiche. Ci sono delle differenze fondamentali tra gli effetti estrogenici e genotossici: i primi sono dose dipendente, recettore-mediati e reversibili; i secondi sono in genere irreversibili (Ben-Jonathan and Steinmetz 1998).

2.2.4 Tossicità

Una recente rassegna della letteratura scientifica indica che il bisfenolo A, alterando la naturale omeostasi ormonale, è in grado di compromettere in maniera variabile il comportamento e lo sviluppo sessuale dei topi. Si è visto che l'esposizione dei ratti a 2.5 ppb di BPA, durante lo sviluppo fetale, porta ad un aumento significativo delle lesioni preneoplastiche nel tessuto mammario (Murray et al. 2007). Tra i topi esposti come feto a dosi di 0.1 ppb di BPA, è stato osservato un aumento delle lesioni neoplastiche e preneoplastiche nell'ovaio e nel tessuto riproduttivo (Newbold et al. 2009). Ratti esposti a 3 dosi singole di 10 ppb di BPA, durante lo sviluppo neonatale, hanno mostrato un aumento significativo del rischio di sviluppare cancro da adulti, soprattutto se in seguito esposti a ormoni steroidei (Ho et al. 2006). In un altro studio è stato utilizzato come modello un adulto femmina di primate sottoposta ad ovariectomia e successivamente trattata con quella che è l'attuale TDI adottata dall'EFSA e dall'FDA, ossia 50 µg/Kg di peso corporeo. Dopo quattro settimane di esposizione si è verificata una significativa inibizione delle vie sinaptiche estradiolo-mediate. Ricordiamo, infatti, che gli ormoni steroidei gonadici esercitano una profonda influenza sullo sviluppo e la plasticità dei circuiti sinaptici nel sistema nervoso centrale, inducendo modificazioni strutturali che regolano la funzione di diversi sistemi di neurotrasmissione. Particolarmente interessanti sono gli effetti degli ormoni gonadici sui circuiti sinaptici dell'ippocampo, area che esprime recettori per gli estrogeni in modo transiente, durante le prime 2 settimane di vita postatale, e risponde agli ormoni gonadici anche nell'adulto. Numerosi studi *in vivo* hanno mostrato che l'esposizione pre-natale e neo-natale a basse dosi di BPA può alterare la normale differenziazione sessuale a livello encefalico nei roditori. Una dose di BPA di 40 µg/Kg può bloccare l'effetto stimolatorio dell'estradiolo sulla sinaptogenesi a livello dell'ippocampo (MacLusky et al. 2005). L'effetto dell'estradiolo sulle sinapsi eccitatorie non sembra diretto ma sembra essere mediato da una riduzione dell'attività degli interneuroni GABAergici che costituiscono il principale sistema inibitorio di quest'

area cerebrale. Dallo studio citato è emersa una riduzione proprio delle sinapsi nei primati, una condizione che viene osservata anche negli stadi iniziali di alcune malattie particolari come l'Alzheimer (Selkoe 2002) e la schizofrenia (Crayton and Meltzer 2007) negli esseri umani.

È noto che gli ormoni tiroidei sono essenziali per il normale sviluppo cerebrale, soprattutto durante la vita fetale e neonatale, e piccole perturbazioni possono influire pesantemente sullo sviluppo. E' stato osservato che il BPA sopprime l'attivazione dei geni regolati dagli ormoni tiroidei nei ratti (Moriyama et al. 2002). Basse dosi di BPA, infatti, sono in grado di alterare l'azione degli ormoni fisiologici T3 e T4 agendo da antagonista. Gli ormoni tiroidei sono d'importanza critica anche per il tessuto nervoso, scheletrico e riproduttivo. I loro effetti dipendono dalla sintesi proteica e dal potenziamento della secrezione dell'ormone della crescita. La mancanza della tiroide nelle prime fasi della vita causa un ritardo mentale irreversibile e nanismo (Palanza et al. 2008); inoltre, valori estremamente bassi di ormoni tiroidei nel corso della gestazione possono determinare un ritardo mentale e l'ipotiroidismo materno, non trattato, nel corso del primo trimestre di gravidanza, o moderati aumenti dei livelli di TSH materni, comportano lo sviluppo di bambini con capacità cognitive ridotte. E' chiaro quindi che il BPA interferisce anche sui sistemi regolati dagli ormoni tiroidei.

Un altro studio ha rivelato che le femmine di topo esposte per breve tempo a basse dosi di BPA hanno manifestato un aumento improvviso e significativo di anomalie genetiche delle cellule uovo (Hunt et al. 2003).

Gli studi sui possibili effetti dell'esposizione al BPA negli umani sono piuttosto limitati; tuttavia livelli di BPA nel sangue sono stati associati, nelle donne, ad una varietà di condizioni patologiche quali obesità, endometriosi, poliabortività, anomalie nel cariotipo, sindrome dell'ovario policistico (PCOS). Infatti, sono stati riscontrati livelli sierici di BPA più elevati in donne che presentavano PCOS, o che

avevano una storia di aborti ripetuti e feti con anomalie cariotipiche (Vandenberg et al. 2007).

Gli estrogeni nel nostro organismo controllano la funzione di diversi tessuti ed è per questo che uno loro squilibrio, causato dall'esposizione ai bisfenoli, si traduce non solo in alterazioni a carico del sistema riproduttivo, ma di tutti i tessuti che sono sotto il controllo di tali ormoni. Bisogna ricordare che uno dei ruoli più importanti degli estrogeni è sicuramente la regolazione della crescita di diversi tessuti. Nella fase della pubertà gli estrogeni sono responsabili dell'accrescimento rapido e della saldatura delle epifisi delle ossa lunghe, ma sono anche necessari nelle donne adulte per il rimodellamento delle ossa. Oltre alla crescita ossea gli estrogeni regolano, nelle donne, la proliferazione e il normale sviluppo dell'utero, della vagina, delle tube e dei caratteri secondari sessuali. Stimolano anche lo sviluppo stromale e la proliferazione dei dotti galattofori mammari. Hanno inoltre un ruolo importante sullo sviluppo dell'endometrio (Katzung 2003).

È stato dimostrato che gli estrogeni svolgono un ruolo importante anche a livello del sistema immunitario e recenti ricerche mostrano che il BPA è in grado di influenzare le funzioni del sistema immunitario. È stato dimostrato che a concentrazioni di 10 nM, il BPA riduce l'indice di adesione di macrofagi peritoneali di ratto *in vitro*. Considerando che l'adesione è il primo step nel processo fagocitico dei macrofagi e nella presentazione dell'antigene, capiamo come il BPA sia in grado di modulare le risposte infiammatorie. Questi effetti sono legati alla capacità del BPA di ridurre l'espressione della proteina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) nella linea cellulare umana MCF-7. Il BPA sembra, anche, agire in maniera variabile anche sulla produzione di immunoglobuline (Vandenberg et al. 2007).

Gli indici comportamentali sono particolarmente sensibili alle perturbazioni del sistema neuro-endocrino, poiché essi rappresentano il punto finale di sistemi

altamente integrati e anche sottili alterazioni in ognuna delle componenti di tali sistemi può riflettersi nell'alterazione del comportamento.

In alcuni lavori sono stati esaminati i sistemi comportamentali sessualmente dimorfici sensibili all'azione di basse concentrazioni di BPA, compatibili con quelle presenti nell'ambiente, durante periodi critici, individuando le possibili alterazioni dei substrati neurali. Topi femmine CD1 sono state addestrate a bere spontaneamente soluzioni di olio di mais contenenti BPA (10, 20 o 40 ug/kg) o senza (controlli), durante l'ultima settimana di gestazione e/o la prima settimana post-parto. La loro prole è stata sottoposta a diversi test comportamentali: esplorazione, comportamento cognitivo, risposta alla ricompensa e comportamento sociale e riproduttivo. I risultati indicano che la prole controllo mostra chiare differenze sessuali nel comportamento in risposta ad un ambiente nuovo e nell'apprendimento di un percorso, mentre la prole esposta a BPA presenta una riduzione o un annullamento delle differenze sessuali (Gioiosa et al. 2007).

Tabella 1. Sommario degli effetti dell'esposizione pre- o peri-natale al BPA (10 microg/kg peso/giorno) sulle differenze sessuali nel comportamento di topi maschi e femmine in diversi paradigmi sperimentali

Paradigma sperimentale	Risposta comportamentale	Controlli	BPA
Risposta alla Novità ^(a) (<i>Novelty-test pre-pubertà</i>)	Ricerca della novità Attività di sostituzione (<i>grooming</i>)	F>M F<M	!F=M !F>M
Esplorazione di un'arena ^(a) (<i>Free-exploratory Open Field</i>)	Esplorazione Locomozione <i>Risk-taking</i> (centro e luce)	F>M F>M F>M	!F=M !F<M! F=M
Labirinto a croce ^(a) (<i>Elevated Plus Maze</i>)	Esplorazione Ansia	F>M F<M	F=M !F=M
Condizionamento ^(b) (indotto da anfetamina; <i>Conditioned Place Preference</i>)	Memoria per la ricompensa (Preferenza per il compartimento associato alla droga)	F>M	!F=M

F=M, il comportamento non differisce tra maschi e femmine; F>M, livelli di comportamento sono significativamente maggiori nelle femmine che nei maschi; F<M, livelli di comportamento sono significativamente minori nelle femmine che nei maschi; !riduzione statisticamente significativa del comportamento in seguito all'esposizione perinatale; ! aumento statisticamente significativo del comportamento in seguito all'esposizione perinatale.

^(a) Esposizione al BPA dal giorno 11 di gravidanza al giorno 7 di allattamento (da 9).

^(b) Esposizione al BPA dal giorno 11 al 18 di gravidanza (da 8).

È stata inoltre monitorata l'attività del sistema noradrenergico nel locus coeruleus e nell'area preottica a seguito di esposizione a BPA. I dati hanno indicato che l'esposizione perinatale riduce le differenze sessuali in queste aree rispetto ai

controlli. Tutto ciò conferma che l'esposizione a basse dosi del bisfenolo A, durante il periodo critico della differenziazione sessuale del sistema nervoso centrale, può esercitare effetti a lungo termine sul comportamento (Palanza et al. 2008).

2.3 Alchilfenoli (APs) come Interferenti Endocrini

Gli alchilfenoli (APs) rappresentano una delle categorie più importanti di Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs); studi su pesci e roditori hanno evidenziato effetti sul sistema di riproduzione e sullo sviluppo. Essi si formano per degradazione nell'ambiente o negli impianti di trattamento delle acque reflue dai rispettivi polietossilati (APEs) (Figura 1), che sono composti largamente utilizzati come tensioattivi in numerose formulazioni chimiche. Hanno in genere elevati fattori di bioconcentrazione (BCF) e si accumulano nei sedimenti e negli organismi acquatici. Uno studio recente ha messo in evidenza livelli di alchilfenoli particolarmente elevati in prodotti ittici dell'Adriatico (Ferrara *et al.* 2001).

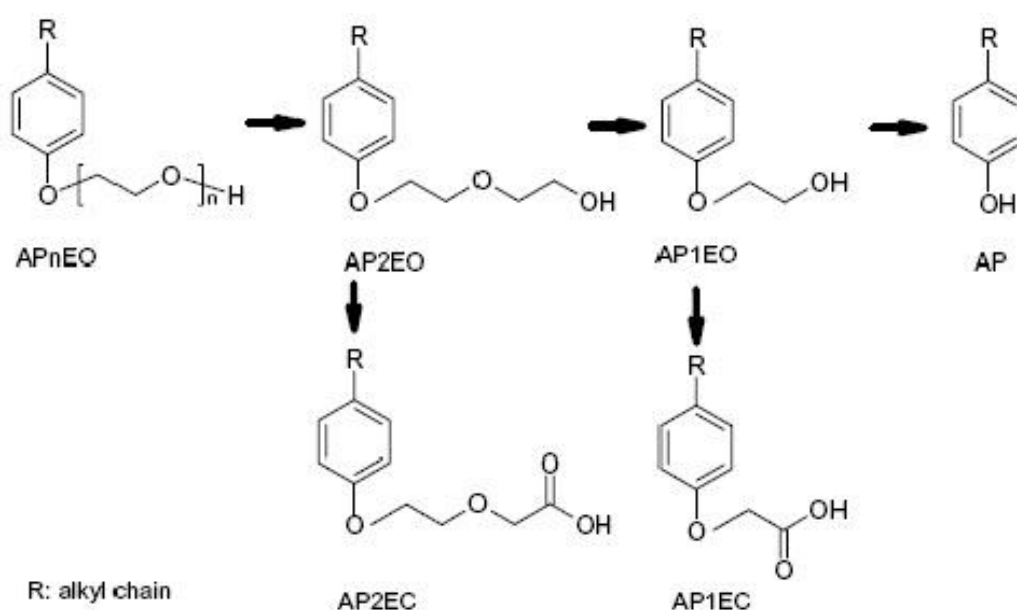


Figura 1. Degradazione degli APEs per dare i corrispondenti derivati non etossilati APs

Gli APs sono composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza. Il nonilfenolo (NP) è utilizzato come intermedio nella produzione di resine fenoliche ed epossidiche, ossime fenoliche, stabilizzanti plastici e trionilfenilfosfito. È inoltre utilizzato nella produzione degli alchilfenoli polietossilati (APEs), in particolare nonilfenoli polietossilati (NPEs). Questi ultimi sono tensioattivi non-ionici largamente utilizzati nei detergenti delle industrie tessili e nelle concerie, in attività

domestiche, nelle vernici, come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e domestico e come emulsionanti in diversi prodotti per l'igiene e l'uso personale (Tyl *et al.* 1999; Naylor 1995).

Il nonilfenolo (NP) ed i composti correlati sono usati come agenti surfattanti e nelle formulazioni dei pesticidi come componenti "inerti" per aumentare la quantità di soluzione spray che rimane sulla superficie delle foglie ed in generale per rendere i pesticidi più potenti (Cserhádi 1995).

Gli AP sono composti idrofobici, con valori di K_{ow} di 4,0 e 4,6 rispettivamente per NP ed ottilfenolo (OP) (Ahel and Giger, 1993), caratterizzati da elevata persistenza ambientale (Brunner *et al.* 1998; Nimrod and Benson, 1996). Vengono considerati contaminanti ubiquitari dell'ambiente acquatico, ove tendono ad associarsi al particolato e ai sedimenti (Nimrod and Benson, 1996; Jobling and Sumpter, 1993; Purdom *et al.* 1994; Jobling *et al.*, 1996; Soto *et al.* 1991; Vos *et al.* 2000).

2.3.1 Effetti degli Alchilfenoli

Tossicità umana acuta. L'esposizione agli APs, attraverso l'ingestione, l'inalazione o l'assorbimento transdermico è in grado di provocare severe irritazioni. Alte concentrazioni sono estremamente pericolose per il tratto respiratorio, gli occhi e la pelle. Sintomi derivanti dall'esposizione includono tosse, voce roca, respiro breve, mal di testa, nausea e vomito.

Mortalità. La quantità di APs in grado di provocare la morte in animali da laboratorio è altamente variabile. Nei topi, la dose letale media (LD_{50} ; la quantità che è in grado di uccidere il 50% della popolazione trattata) varia da 400 mg/kg di peso corporeo a 1620 mg/kg di peso corporeo (National Research Council of Canada 1982). Gli APEs sono meno tossici in caso di esposizione acuta; la più bassa concentrazione letale (LD_{50}) riportata è 1650 mg/kg di peso corporeo (White *et al.* 1994).

Esposizione dermica. Il contatto prolungato tra alchilfenoli e la pelle prova ustione, irritazione e gonfiore (National Research Council of Canada 1982). Quando applicato sulla pelle dei conigli, provoca distacco della pelle; sintomi addizionali includono diarrea, congestione dei polmoni e del fegato e macchiatura dei reni. Il nonilfenolo è stato classificato come “severamente irritante” mentre gli etossilati, che presentano da 2 a 9 unità etilen ossidi sono “ da moderatamente a severamente irritanti”. Quando il NP è applicato sulla pelle del maiale, ripetute volte, in seguito all’ennesima esposizione, ha mostrato una più intensa risposta, rispetto alla reazione successiva alla prima applicazione, che viene definita come reazione di sensibilizzazione (National Research Council of Canada 1982; U.S. EPA 1993).

Occhi. Una piccola quantità di nonilfenolo (inferiore al dodicesimo di millilitro) causa una severa irritazione nei conigli (National Research Council of Canada 1982). La Texaco Chemical Company ritiene che il danno possa essere permanente (White et al. 1994). Soluzioni non diluite di APEs sono pericolosamente irritanti; una soluzione al 10% è da moderatamente a severamente irritante (White et al. 1994).

Altri effetti acuti tossici. Sia gli APs che gli APEs inibiscono una delle reazioni (il trasferimento degli elettroni) che avviene nella cellula per incamerare energia ottenuta dalla dieta (Agre et al. 1994; Michelangeli et al. 1990). Gli APs inoltre inibiscono l’attività di un’enzima (ATPase) che è essenziale nel processo che fornisce energia alle cellule muscolari (Michelangeli et al. 1990).

Effetti sul Sistema circolatorio. Cani alimentati con APEs, costituiti da 17 a 20 unità etilen ossido, per 90 giorni, hanno sviluppato tessuto necrotico sul tessuto muscolare cardiaco. Nei gatti, la somministrazione di APEs a 20 unità di etilossido impedisce al cuore di contrarsi normalmente (White et al. 1994).

Effetti sulla Riproduzione. Gli APEs danno problemi riproduttivi in animali da laboratorio. I problemi dati dagli etossilati a 9 unità includono infiammazione della vagina nei conigli, infiammazione della vagina seguita dall'estensione dell'utero nei ratti, riduzione del numero di embrioni vivi nei ratti e riduzione del numero di impianti embrionali nei ratti con un aumento di casi di endometriosi (Rier et al. 1993). In più, gli APs sono in grado di avere effetti importanti sui processi riproduttivi in quanto possiedono attività estrogenica. Questo significa che sono in grado di mimare l'attività degli estrogeni, gli ormoni responsabili dello sviluppo ed il mantenimento delle caratteristiche sessuali secondarie e comportamentali. Le molecole estrogeno-simili interferiscono con il normale funzionamento del sistema ormonale, determinando la nascita di problemi riproduttivi. Nonostante le prime evidenze dell'attività estrogenica degli alchilfenoli siano datate 1978 (Mueller and Kim 1978) solo recentemente la loro attività da interferente endocrino sta ricevendo maggiore attenzione (Soto et al. 1991). Numerosi studi mostrano che il NP possieda attività estrogenica. Per esempio, il NP ed i composti correlate si legano ad un recettore per gli estrogeni, una specifica struttura proteica all'interno della cellula che risponde al legame con tali molecole. Il complesso estrogeno- recettore gestisce quella parte del materiale genetico che governa la divisione cellulare (Davis and Bradlow 1995). Il NP è meno potente nel legame con il recettore rispetto agli estrogeni veri e propri ed all' ottilfenolo (OP), suo congenero strutturale, ma più potente del corrispondente acido carbossilico (U.S. EPA 1995). Il NP provoca incremento della divisione cellulare sulle pareti dell'utero di ratto (Soto et al. 1991) e provoca allargamento dello stesso nei soggetti più giovani (Bicknell et al. 1995), entrambe sono attività tipicamente estrogeniche. Come il nonilfenolo, e gli APs, possano esattamente interferire nel processo di riproduzione, è solo parzialmente compreso.

Un recente studio sull'ottilfenolo e sull'ottilfenolo etossilato si focalizza sui tipi di problemi la cui esposizione può provocare (Sharpe 1995). In tale studio, madri di ratti sono state alimentate con ottilfenolo (o il suo etossilato) durante la loro

gravidanza e l'allattamento. Quando i figli hanno raggiunto l'età adulta, i maschi presentavano caratteristiche poco pronunciate ed un basso peso corporeo. La produzione di sperma di molti dei figli, nati dalle madri esposte all'ottilfenolo, è stata misurata ed è risultata tra il 10 ed il 20% inferiore rispetto ai ratti non esposti. I risultati dello studio sono stati impressionanti considerando che le dosi a cui le madri erano esposte erano basse, tra 0.1 and 0.4 mg/ kg di peso corporeo al giorno. Il nonilfenolo possiede effetti simili ma li provoca in dosi maggiori per il fatto che non ha un'attività estrogeno mimetica così marcata come l'ottilfenolo.

Carcinogenicità. L'attività estrogeno simile del nonilfenolo lascia pensare alla capacità di questa molecola, e dei suoi congeneri strutturali, di provocare cancro (in particolare quello del seno), dato che molti tipi di cancro sono associati con un'esposizione agli estrogeni. Allo scopo di valutarne gli effetti, gli APs sono stati testati su colture di celle cancerogene mammarie. In questo studio, gli estrogeno e le molecole estrogeno simili sono state in grado di aumentare la proliferazione cellulare. Ottilfenolo, Nonilfenolo ed il suo precursore dietossilato, nonché il derivato carbossilico del nonilfenolo, sono risultati i più potenti (U.S. EPA 1995; Soto et al. 1995); aumentano i danni cancerogeni provocati da altre molecole in grado di indurre la proliferazione delle cellule cancerogene. Ratti alimentati con acqua contenente la sostanza cancerogena MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanadina) e nonilfenolo etossilato sviluppano più rapidamente tumore allo stomaco ed all'intestino rispetto a ratti alimentati con acqua contenente solo MNNG (White et al. 1994)

Mutagenicità. Mentre molti test per valutare la capacità mutagena degli alchilfenoli etossilati sono risultati negativi, ottilfenolo etossilato e nonilfenoli etossilato (entrambi con nove unità di etilen ossido) hanno mostrato la capacità di indurre danno al DNA in uno dei più importanti test usati per la valutazione di tali tipi di effetti (White et al. 1994).

2.4 Bisfenoli ed Alchilfenoli negli alimenti

2.4.1 Impieghi industriali dei Bisfenoli

L'esposizione ai bisfenoli è dovuta principalmente all'impiego del policarbonato come materiale per la produzione dei contenitori in plastica per gli alimenti. Nonostante le plastiche siano composti stabili, il legame chimico tra le molecole di Bisfenolo A è molto instabile e, di conseguenza, tali molecole vengono facilmente cedute venendo così a contatto con l'organismo umano.

Il Bisfenolo A è usato anche come monomero di base nella produzione di resine epossidiche, tra cui sono comprese quelle epossifenoliche, le quali sono utilizzate come componenti del rivestimento protettivo interno di contenitori per alimenti e bevande, ma anche come rivestimento per i coperchi in metallo di barattoli e bottiglie di vetro; inoltre tali resine vengono usate anche come rivestimento per i serbatoi domestici.

Il Bisfenolo A, non legato in modo stabile con l'epicloridrina, è libero di diffondere negli alimenti che vengono a contatto con esso.

I bisfenoli oltre ad essere usati come monomeri di base per la sintesi del policarbonato e le resine epossidiche possono essere utilizzati anche come additivi in diversi tipi di imballaggi. Gli scopi della loro aggiunta possono essere diversi.

E' già noto, infatti, che il BPA, come il Bisfenolo A diglicidil etere (BADGE), un altro congenere della classe dei bisfenoli, sono utilizzati come additivi per l'effetto antiossidante o allo scopo di eliminare le eccedenze di acido cloridrico nel corso del processo di produzione di PVC (polivinil cloruro) (Cao et al. 2009) che diventa, pertanto, un'ulteriore fonte di BPA, pur non essendo quest' ultimo un monomero di base per la sua sintesi.

Congeneri strutturali del BPA, ugualmente utilizzati dall'industria dei polimeri, presentano una tossicità paragonabile od anche superiore al BPA.

Inoltre la migrazione da bisfenolo nell'alimento può avvenire anche durante la manifattura per contatto con materie plastiche, resine e rivestimenti polimerici delle macchine di manifattura. Infine, un'ulteriore fonte di contaminazione è l'assunzione dall'ambiente negli alimenti ed il trasferimento nella catena alimentare.

2.4.1.1 Policarbonato e polieteresulfone

2.4.1.1.1 *Policarbonato*

Esistono vari tipi di policarbonati, aromatici ed alifatici; tra questi il policarbonato (PC) del 2,2-bis-(4-idrossifenil)propano, comunemente noto come policarbonato del bisfenolo A, è quello commercialmente più importante. Questo polimero fu sintetizzato per la prima volta presso il centro di ricerca e sviluppo della General Electric e poi dalla Bayer, ed è stato prodotto industrialmente e posto sul mercato a partire dal 1959. Da allora sono state riportate in letteratura e brevettate varie composizioni basate su altri dioli, ma, fino ad ora, nessuna di queste ha raggiunto il successo dell'originale policarbonato del bisfenolo A. Il consumo mondiale di policarbonato ha visto un'enorme espansione a causa dell'eccellente combinazione di proprietà meccaniche, ottiche e chimiche, non presenti in altri materiali termoplastici. Il policarbonato è resistente ai solventi è insolubile in acqua, alcoli e idrocarburi alifatici (Freitag et al. 1988) ma solubile in idrocarburi clorurati e possiede stabilità termica, può essere riscaldato fino a 310°C senza che si abbia una rilevante decomposizione (Fox 1992). La degradazione comincia oltre i 320°C e la perdita dei componenti leggeri oltre i 400°C. L'infiammabilità è bassa e può essere ulteriormente migliorata mediante l'aggiunta di additivi. I policarbonati commerciali hanno un peso molecolare medio numerico (M_n) compreso tra 20000 e 200000, a seconda del processo di polimerizzazione usato, e le proprietà

meccaniche come la resistenza all'impatto, alla trazione e alla flessione, mostrano una forte dipendenza da M_n fino a 22000, oltre questo valore crescono molto lentamente. Circa le proprietà ottiche il PC presenta un elevato indice di rifrazione (1.584), a causa della presenza di gruppi aromatici, è permeabile alla luce nel campo visibile del 90%; al contrario, assorbe la luce UV, causando ingiallimento e riduzione della resistenza all'impatto per esposizioni prolungate. I principali settori industriali che utilizzano il polycarbonato sono quello dell'elettronica, della produzione di sistemi ottici per l'immagazzinamento dei dati, compact disc (CD), il settore edilizio principalmente per finestre e rivestimenti; il settore automobilistico, per le coperture dei fanali e caschi, il settore ottico, per la produzione di lenti e maschere protettive; altre importanti aree di impiego comprendono la produzione di materiale da ufficio, applicazioni in campo medico, imballaggi alimentari, applicazioni domestiche.

La sintesi del polycarbonato è eseguita facendo reagire il bisfenolo A con una base forte (ad esempio idrossido di sodio); in queste condizioni il bisfenolo si comporta da acido e si trasforma in bisfenato che a sua volta è fatto reagire con il fosgene per ottenere il polycarbonato. L'unico inconveniente relativo alla produzione del PC è proprio l'impiego del fosgene che è un gas estremamente tossico. Per avere delle velocità di reazione rilevanti è necessaria un'elevata superficie interfacciale, ottenibile con una buona agitazione. Teoricamente la catena potrebbe crescere all'infinito, il che determinerebbe una coagulazione del preparato o comunque resine ad alto peso molecolare con viscosità troppo elevate per poter essere lavorate; pertanto al fine di mantenere il peso molecolare entro certi limiti vengono aggiunti monomeri monofunzionali come terminatori di catena, la cui concentrazione sarà tanto più alta quanto più basso è il peso molecolare del polimero che si vuole ottenere. I terminatori più comunemente utilizzati sono fenoli (fenolo e *p*-*t*-butilfenolo) perché la loro struttura e reattività sono molto simili a quella del bisfenolo A; inoltre la struttura chimica dei gruppi terminali conferisce proprietà differenti al polimero finale.

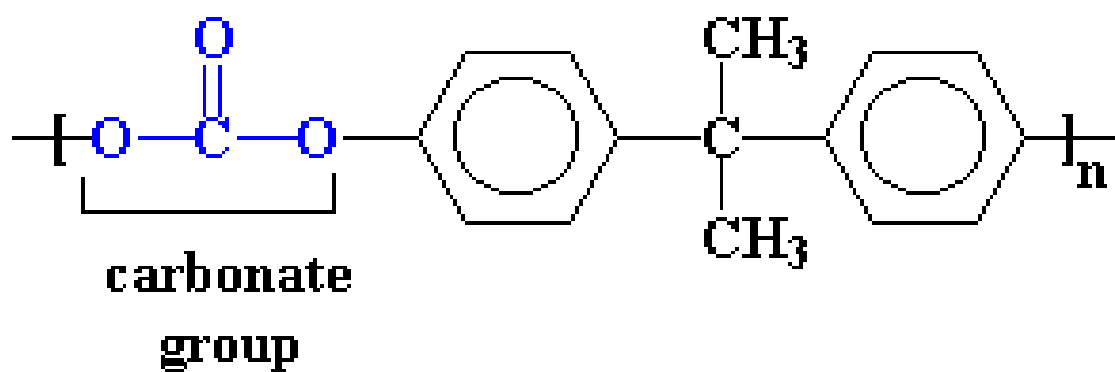


Figura 1. Struttura del policarbonato

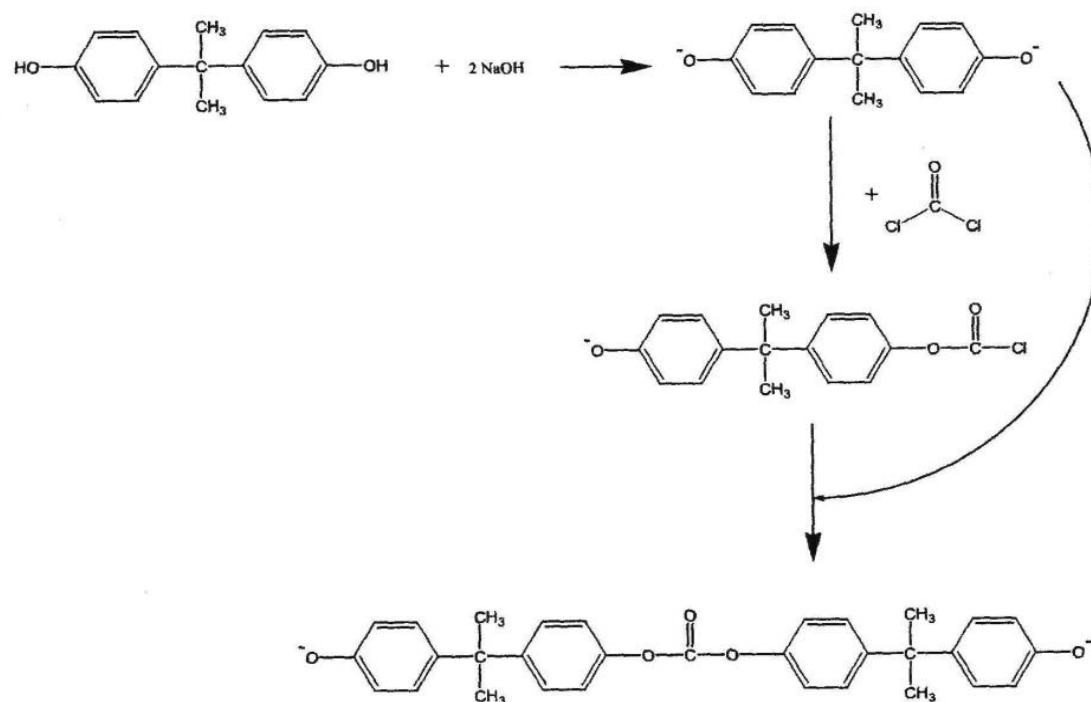


Figura 2. Schema di reazione per la polimerizzazione del PC

2.4.1.1.2 Polieteresulfone

Il polieteresulfone (PES) è un tecnopolimero ad alte prestazioni, una resina amorfa con le eccezionali proprietà meccaniche dei polimeri cristallini. Il più comune è creato dalla Union Carbide. Il polieteresulfone resiste bene all'acqua ed al vapore, ed è molto più resistente al calore rispetto al PC. È usato per produrre utensili da cucina prodotti medicali che necessitano della sterilizzazione tra un uso e l'altro.

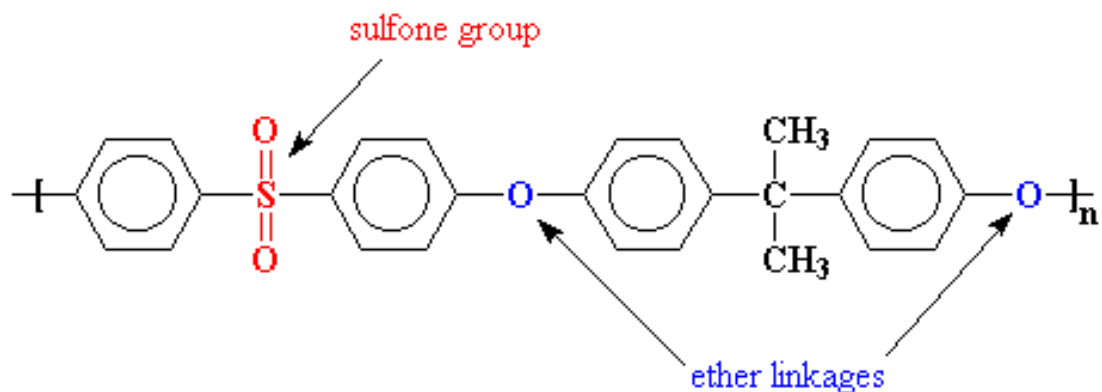


Figura 3. Struttura del polieteresulfone. Sono evidenziati i gruppi sulfone e i legami eterici

Il polieteresulfone prende il nome dai gruppi eterici e sulfone presenti nella catena principale. I polimeri in PES hanno un'elevata temperatura di transizione vetrosa perché i gruppi sulfone sono rigidi, e questo non consente loro di essere processati. Al fine di conferire una maggiore flessibilità alla catena si inseriscono i ponti eterici (ether linkages) derivanti dal bisfenoloA.

La sintesi del PES avviene a partire dal sale sodico del bisfenolo A che è fatto reagire con il diparafluorofenilsulfone in un solvente come il dimetilsolfossido (DMSO) tra i 130°C e i 160°C.

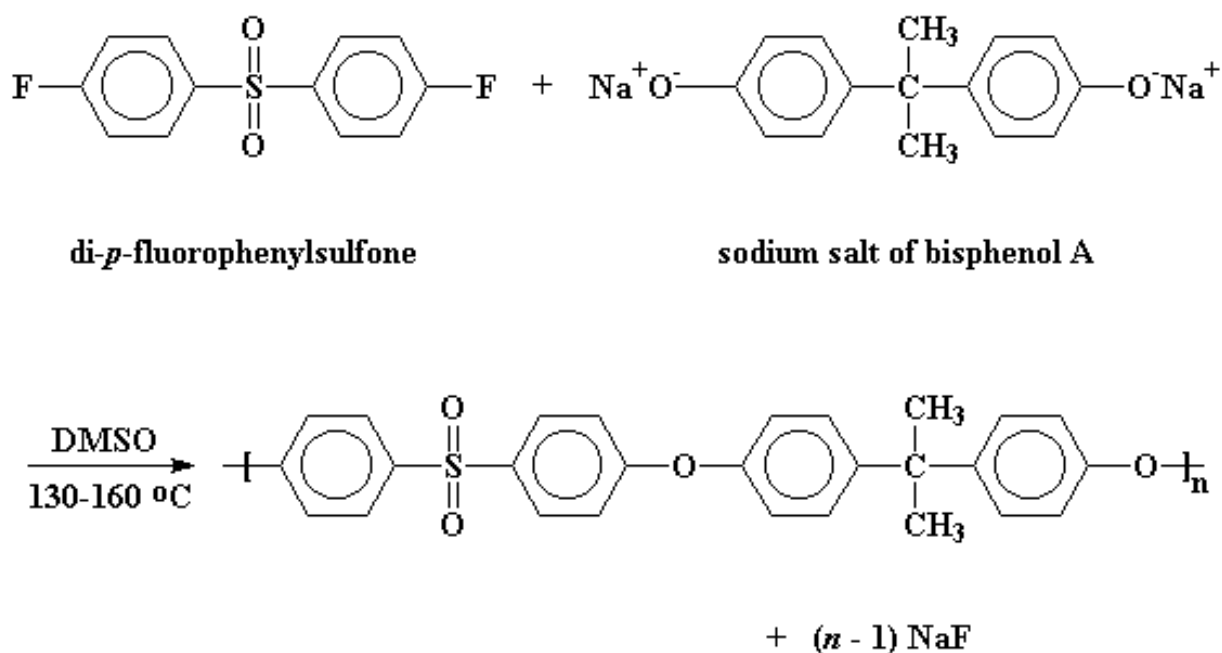


Figura 4. Schema di reazione per la polimerizzazione del PES

2.4.1.1.3 Le resine epossidiche

Il Bisfenolo A è usato anche come monomero di base nella produzione di resine epossidiche, tra cui sono comprese quelle epossifenoliche, utilizzate come componenti del rivestimento protettivo interno di contenitori per alimenti e bevande, e come rivestimento per i coperchi in metallo di barattoli e bottiglie di vetro; tali resine sono inoltre usate come rivestimento per i serbatoi domestici.

La struttura generica di una resina epossidica, in particolare epossifenolica, è la seguente:

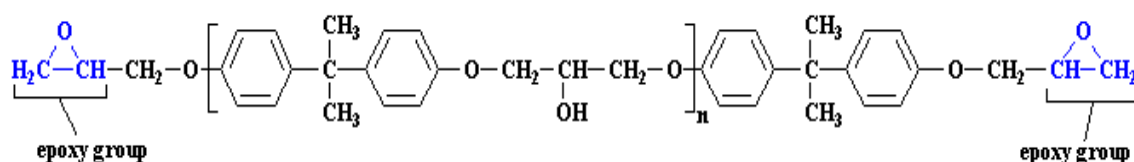


Figura 5. Struttura di una resina epossifenolica

Le resine epossidiche sono materiali polimerici termoidurenti largamente usate in rivestimenti protettivi o altre applicazioni, quali materiali elettronici, compositi strutturali, pavimentazioni e adesivi. Sono caratterizzate dalla presenza di due o più gruppi epossidici per molecola. Le resine epossidiche vengono sottoposte a trattamenti termici “curing”, che mediante un agente curante (o anche detto indurente) promuovono reazioni di reticolazione, ottenendo materiali polimerici infusibili, fragili e con buone proprietà meccaniche. Questi termoidurenti mostrano una combinazione di proprietà quali, un'eccellente resistenza meccanica e chimica, alla corrosione, buone proprietà termiche, elettriche e stabilità dimensionale.

Agendo sulla formulazione della miscela di reazione, cioè modificando il contenuto di resina epossidica, agenti curanti e eventuali cariche e modificanti, è possibile variare e bilanciare opportunamente queste proprietà, al fine di ottenere un materiale specifico per l'uso a cui è destinato.

Le caratteristiche di queste resine epossidiche sono dovute al:

- BPA, che grazie alla presenza nella sua struttura di anelli aromatici, conferisce durezza e resistenza anche ad alte temperature;
- ai legami eteri, responsabili della resistenza chimica;
- ai gruppi epossidici e ossidrilici, che conferiscono proprietà adesive.

Le resine epossidiche (Figura 6) vengono prodotte dalla reazione tra il Bisfenolo A e l'epicloridrina con NaOH come catalizzatore.

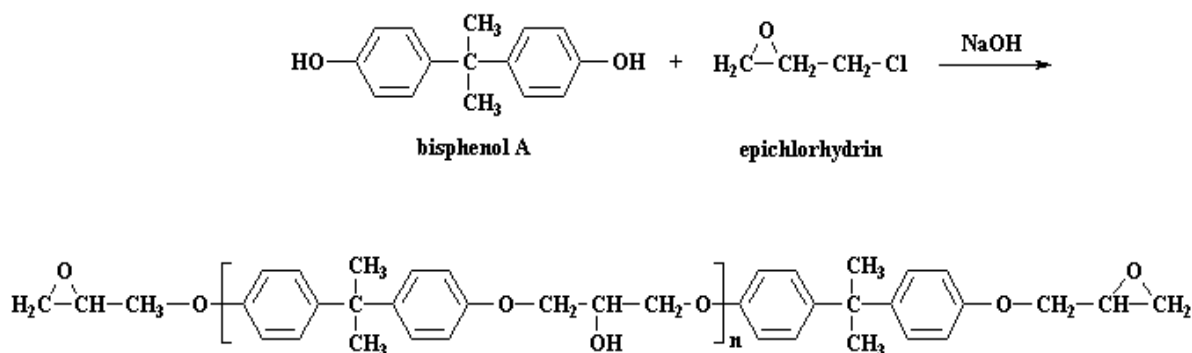


Figura 6. Sintesi della resina epossidica

Il Bisfenolo A, non legato in modo stabile con l'epicloridrina, è libero di diffondere negli alimenti che vengono a contatto con esso. Tale migrazione del Bisfenolo A dai contenitori è influenzata dal tempo e dalla temperatura usata durante il processo di produzione (Munguía-Lopez et al. 2001)

2.4.2 Alchilfenoli e food packaging

Il nonilfenolo (NP) è un composto ad attività endocrina molto studiato (Soto et al. 1991) che è ampiamente presente nei cibi (Guenther et al. 2000).

Nei materiali a contatto con gli alimenti, il NP si origina dall'ossidazione di un additivo ad attività antiossidante, il trisonilfenil fosfito (TNPP) (McNeal et al. 2000), per il cui utilizzo la Commissione Europea non impone nessun limite a riguardo, né di composizione né tantomeno di quantità residuale tollerata in grado di essere rilasciata dal materiale all'alimento (EU 2011). Il 4-tert.-OP, suo congenere strutturale, è usato come intermedio nella manifattura di resine fenolo/formaldeide e come plastificante per la produzione di ruote (Raecker et al. 2011).

La presenza del NP è stata riscontrata in numerosi materiali destinati al contatto con gli alimenti ed i livelli sono risultati in un range da 0.03 µg/g, in bottiglie in PET, a 287 µg/g, in pellicole di PVC (Fernandes et al. 2008). Il NP è inoltre stata determinato in diversi matrici a contatto con tali tipi di materiale; livelli superiori ai

78 ng/L sono stati ritrovati in acqua contenuta in bottiglie di PET (Toyo'Oka and Oshige, 2000) ed è stato riscontrato in quantità superiori a 40 µg/kg in latte intero in brick ed in quantità superiori a 32.3 µg/kg in latte in bottiglie HDPE (Casajuana and Lacorte 2004).

I risultati di uno studio condotto in tempi recenti, in Germania, hanno mostrato come il nonilfenolo sia ubiquitario negli alimenti per bambini mentre il 4-tert.-OP è stato determinato solo nell'80% dei campioni analizzati (Raecker et al. 2011).

Per valutare la reale esposizione degli esseri umani agli alchilfenoli devono essere sviluppati nuovi metodi al fine di verificare la reale presenza di tali sostanze negli alimenti attraverso i quali si può verificare una loro assunzione involontaria (Muncke 2009).

2.5 Procedure analitiche per la determinazione nei cibi dei livelli di sostanze ad attività endocrina

2.5.1 Determinazione dei livelli di bisfenoli in campione di latte

Lo scopo di tale lavoro è stato il monitoraggio simultaneo dei livelli di cinque bisfenoli - Bisfenolo A (BPA), Bisfenolo B (BPB), Bisfenolo F (BPF), Bisfenolo A diglicidil etere (BADGE), and Bisfenolo F diglicidil etere (BFDGE) - in campioni di latte italiano venduto in bottiglie di plastica.

A questo scopo è stata sviluppata una metodica analitica *ad hoc* semplice ed efficace per l'analisi della matrice alimentare prescelta. La procedura analitica ha previsto l'applicazione della tecnica di estrazione in fase solida (SPE) per l'estrazione degli analiti dalla matrice e successivamente l'analisi quali-quantitativa mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza.

2.5.1.1 Parte Sperimentale

Preparazione del campione ed Estrazione su fase solida (SPE)

Differenti marche di latte pastorizzato o UHT sono stati reperiti in diversi supermarket del territorio italiano. La data di scadenza del latte pastorizzato variava da uno a tre giorni successive al momento dell'analisi mentre per i campioni di latte UHT era di almeno un mese.

Da ciascuna bottiglia di latte, sono stati prelevati 10 mL di latte a cui sono stati aggiunti 10 mL di metanolo. Per favorire l' estrazione degli analiti, i campioni sono stati posti in un bagnetto ad ultrasuoni per 10 minuti (Branson 2210). L'azione degli ultrasuoni favorisce la miscelazione del latte col metanolo e la rottura dei suoi globuli di grasso, assicurando recuperi più elevati dei bisfenoli eventualmente presenti nei campioni. Ciascun campione è stato successivamente diluito con acqua deionizzata in matraccio fino ad un volume di 100 mL e caricato su colonnina SPE. Per verificare l'assenza di picchi relativi a sostanze interferenti sono stati utilizzati, come prove in bianco, campioni di latte in bottiglie di vetro, previamente testati per verificare l'assenza di bisfenoli. Per verificare l'affidabilità ed i recuperi del metodo, i campioni di controllo sono stati addizionati di BPA, BPB, BPF, BADGE and BFDGE a tre differenti livelli di arricchimento con concentrazione finale dei cinque analiti di 14.5 ng/g (concentrazione inferiore), 75.0 ng/g (concentrazione media) and 375 ng/g (concentrazione superiore).

Per l'estrazione degli analiti dalla matrice sono state utilizzate colonnine SPE di tipo CHROMABOND C18 (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Le colonnine sono state condizionate ed equilibrate con 5 mL di acetonitrile e 5 mL di acqua deionizzata. Il campione è stato caricato su cartuccia e, quindi, si è proceduto al lavaggio con 20 mL di una miscela acqua/acetonitrile 80:20 (v/v). Sia il caricamento del campione che il lavaggio della colonnina sono stati effettuati sotto vuoto. Dopo il lavaggio, la

cartuccia è stata asciugata sotto vuoto per 15 minuti e poi per altri 3 minuti mediante flusso di azoto. Gli analiti sono stati eluiti con 5 mL di acetonitrile a caduta libera. L'eluato ottenuto è stato successivamente sottoposto ad analisi mediante HPLC.

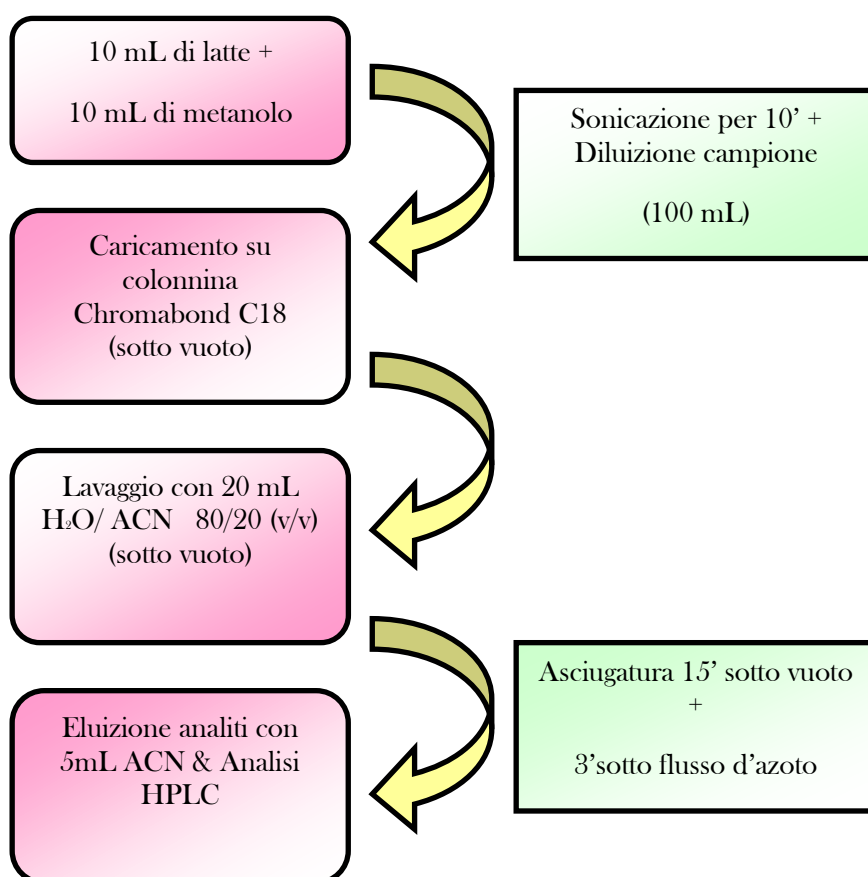


Figura 1. Schema riassuntivo della procedura di estrazione degli analiti (BPA e BPS) dal latte.

Analisi HPLC

Per l'analisi dei campioni all'HPLC è stato utilizzato un cromatografo LC-10AD VP (Shimadzu- Corporation, Kyoto, Japan), munito di loop da 20 μ L, ed è stata adoperata una colonna a fase inversa Synergi 4 μ -Fusion RP80A (250 x 4,60 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA) munita di una pre-colonna a fase inversa Synergi 4 μ . Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile/acqua 60:40 (v/v).

Le analisi sono state effettuate a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) ad un flusso di 0.5 mL/min. Come sistema rivelatore è stato utilizzato un detector a fluorescenza (Waters 470) settato ad una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 273 nm e ad una lunghezza d'onda d'emissione di 300 nm.

I segnali provenienti dal rivelatore sono stati registrati utilizzando il programma Chromatoplus 2007 (Shimadzu-Corporation, Kyoto, Japan). Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

Campioni di latte provenienti da bottiglie di vetro, previamente testati per verificare l'assenza degli analiti in esame, sono stati assunti come bianco ed usati sia per verificare l'assenza di picchi interferenti e sia, dopo arricchimento, per confermare l'identità dei picchi, la precisione del metodo ed i recuperi. Sotto le condizioni sperimentali citate, i tempi di ritenzione (t_r) dei cinque bisfenoli analizzati sono stati: BPF 8.50 ± 0.30 min, BPA 11.31 ± 0.40 min, BPB 13.41 ± 0.40 min, BFDGE 21.50 ± 0.30 , BADGE 31.05 ± 0.30 min. L'analisi quantitativa dei bisfenoli è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard interno che ci ha permesso di costruire una curva di calibrazione per ciascuno dei cinque analiti correlando l'area del picco cromatografico, ottenuta dopo ogni iniezione degli standard, con la rispettiva concentrazione ($\mu\text{g/mL}$). La curva di calibrazione è stata ottenuta dall'analisi dei campioni di controllo arricchiti di ciascun bisfenolo a cinque differenti livelli di concentrazione compresi tra 0.025 e 0.50 $\mu\text{g/mL}$, a seconda dell'analita. 60 μL di ciascun standard, ossia tre volte il volume del loop, sono stati iniettati nel sistema HPLC ed il segnale del FD è stato registrato. Nell'intervallo di concentrazione considerato, è stata osservata una forte correlazione per tutti i bisfenoli analizzati (BPF, BPA, BPB, BFDGE, BADGE) con il detector a fluorescenza. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard dei triplicati di tre bottiglie di latte della stessa marca con lo stesso numero di lotto.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato usato un pacchetto commerciale per analisi statistiche (Microsoft Excel 2007). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Spettrometria di Massa

La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando un HPLC munito di due micropompe Series 200 (Perkin Elmer, Shelton, USA), con l'ausilio della stessa colonna a fase inversa e delle stesse condizioni cromatografiche descritte nel paragrafo *Analisi HPLC*.

L'analisi spettrometrica di massa dei cinque bisfenoli è stata effettuata su uno spettrometro di massa API 3000 triplo quadrupolo (Applied Biosystems, Canada) con sorgente Turbo-Ion Spray.

Le condizioni di ionizzazione sono state ottimizzate per infusione diretta nello MS della soluzione standard dei cinque bisfenoli (10 $\mu\text{g/mL}$) ad un flusso costante di 8 $\mu\text{L/min}$. Il drying gas (aria) è stato riscaldato a 400°C, il capillary voltage (IS) è stato settato a -4000 V ed il declustering potential (DP) è stato settato a -60V. L'analisi è stata condotta in SIM (Single Ion Monitoring), in modalità negativa. Gli ioni monitorati [M-H]⁻ sono stati: m/z 227 per BPA, m/z 241 per BPB, m/z 198 per BPF, m/z 339 per BADGE e m/z 311 per BFDGE.

Risultati

SPE e Analisi cromatografica

In una fase iniziale del lavoro è stata valutata quale procedura estrattiva potesse essere la migliore per il recupero dei cinque bisfenoli dalla matrice analizzata.

Tre diversi tipi di colonnine SPE sono state testate (ChemElut™, Extrelut™, C18 Chromabond™) e la colonnina C18 Chromabond SPE è risultata la più efficace nel ridurre drasticamente le interferenze della matrice. La procedura ha inoltre permesso di ottenere alte percentuali di recupero, calcolati su campioni arricchiti. Ottimi valori sono stati ottenuti per tutti gli analiti, BPF 92.8 % (RSD 2.68%), BPA 106 % (RSD 2.15%), BPB 105 % (RSD 2.03%), BFDGE 97.9 % (RSD 3.45%), and BADGE 94.5 % (RSD 3,90%).

Tre differenti livelli di arricchimento sono stati preparati nello stesso modo a concentrazione pari a 14.5 ng/g, 75.0 ng/g ed a 375 ng/g per i cinque analiti. I campioni arricchiti sono stati sottoposti alla procedura estrattiva così come indicato nella sezione *Preparazione del campione*. I recuperi per tutti i bisfenoli sono stati calcolati su campioni arricchiti preparati per addizione di ciascun analita ai campioni di latte in bottiglie di vetro, previamente testate per verificare l'assenza degli analiti in esame, in concentrazione compresa in un range da 0.0025 µg/ml a 0.50 µg/ml, a seconda dell'analita.

La Figura 2 mostra il cromatogramma di una soluzione standard dei cinque bisfenoli ottenuta dall'analisi HPLC/FD. L'analisi qualitativa è stata effettuata per comparazione dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nei campioni reali con quelli ottenuti per BPF, BPA, BPB, BFDGE e BADGE nei campioni arricchiti. Per l'analisi quantitativa, le procedure di calibrazione sono state effettuate utilizzando soluzioni standard dei cinque bisfenoli e ripetute ogni due settimane; in questo periodo il coefficiente di variazione (CV) è stato $< 0.5\%$. Le soluzioni sono state iniettate all'HPLC immediatamente dopo la preparazione e non sono stati osservati prodotti di degradazione.

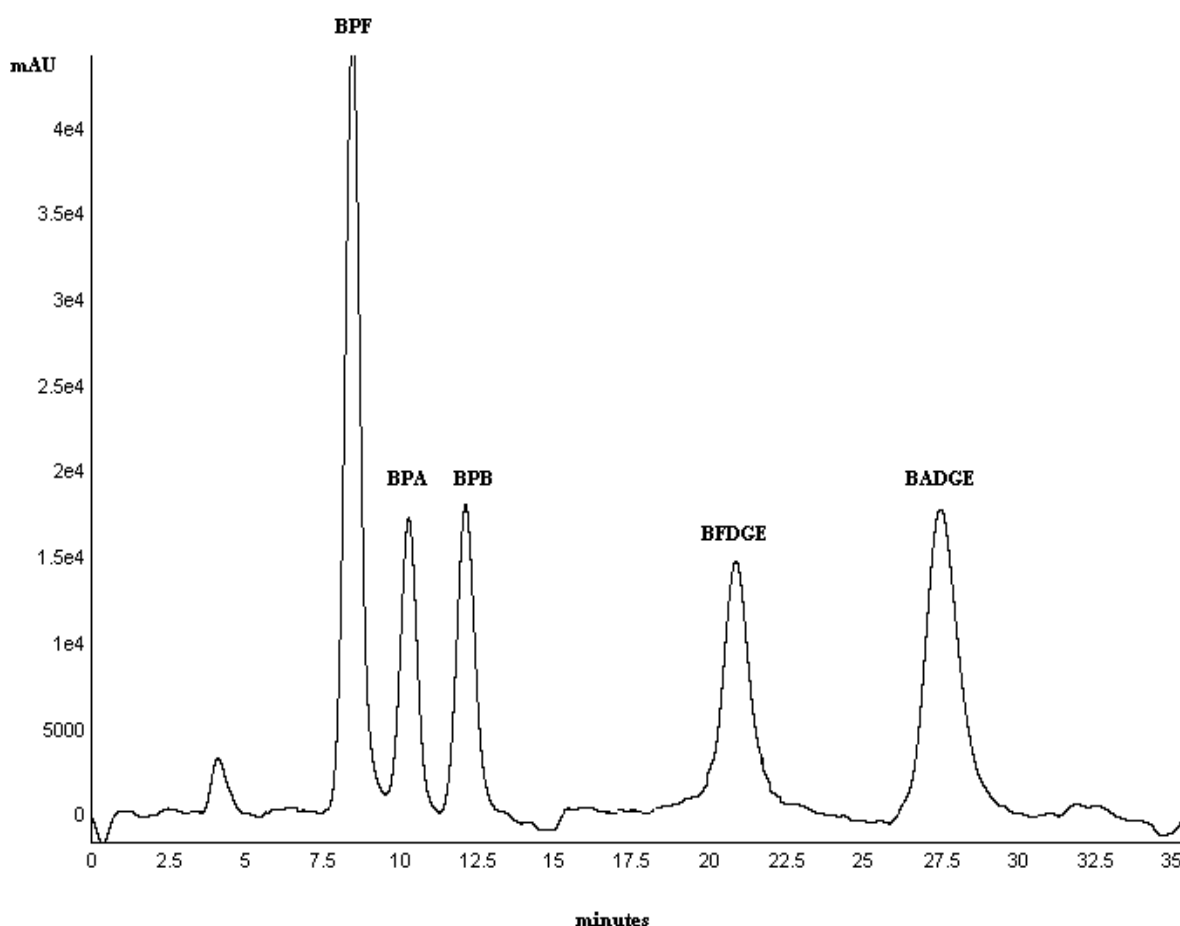


Figura 2. Cromatogramma di una soluzione standard dei cinque analiti a concentrazione 0.2 $\mu\text{g/mL}$

I campioni trovati positivi ad almeno uno dei bisfenoli sono stati sottoposti ad analisi attraverso spettrometria di massa per confermare ulteriormente l'identità dei picchi.

Validazione del metodo

Tutte le procedure di validazione del metodo sono state condotte su una colonna Synergi 4 μ Fusion-RP80Å.

La linearità è stata calcolata analizzando l'intensità dei segnali provenienti dal rivelatore in funzione delle concentrazioni di analita, utilizzando il metodo dei minimi quadrati.

Per la costruzione delle rette di calibrazione, sono state utilizzate cinque soluzioni standard a concentrazioni comprese tra 0.0025-0.5 $\mu\text{g/mL}$ e per ogni livello di concentrazione le analisi sono state condotte in triplicato. I coefficienti di correlazione ottenuti sono stati compresi in un range tra 0.9967 e 0.9997.

Il limite di rilevabilità (LOD) della tecnica analitica è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere determinata con una certezza statistica nel campione, ed è equivalente a 3 volte la deviazione standard del rumore di fondo registrato durante l'analisi; il limite di quantificazione (LOQ) è calcolato come la concentrazione dell'analita che garantisce un segnale pari a 10 volte la deviazione standard del rumore di fondo durante l'analisi.

Con il detector a fluorescenza (FD), i valori di LOD per BPA, BPB, BPF BADGE e BFDGE, sono risultati compresi tra 0.0025 e 0.0082 $\mu\text{g/mL}$, mentre i valori di LOQ tra 0.0083 e 0.0141 $\mu\text{g/mL}$. (Tabella 1).

La robustezza del metodo analitico è stata valutata su tre differenti colonne a fase inversa utilizzando diverse condizioni di eluizione HPLC: i) Synergi 4 μ Fusion-RP80Å 250 x 4.60 mm i.d., acqua/acetonitrile 40:60 (v/v), ii) Onyx monolithic C₁₈ 100 x 4.6 mm i.d. (Phenomenex, Torrance, CA) acqua/acetonitrile 65:35 (v/v), iii) Sphèreclone 5 μ ODS 2 250 x 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA) acqua/acetonitrile 50:50 (v/v). La risoluzione dei picchi è rimasta simile nonostante le differenti condizioni cromatografiche.

La precisione è la misura di come i risultati ottenuti siano vicini tra loro ed è valutata effettuando analisi ripetute nello stesso giorno ed in giorni diversi. Un'ottima precisione interday ($n = 10$) ed intraday ($n = 5$) è stata ottenuta con il detector utilizzato. La RSD % (deviazione relativa standard) è risultata compresa tra 0.018 e 2.99 per le analisi eseguite nei giorni differenti, e tra 0.05 e 2.98 per quelle eseguite nello stesso giorno. I valori di RSD % sono stati calcolati dividendo la deviazione standard per la media, e moltiplicando tutto per 100.

Bisphenol	Slope (a)	Intercept (b)	r	n	Limit of detection (LOD) μg/mL	Limit of quantification (LOQ) μg/mL
BPF	45179	66.746	0.9997	5	0.0025	0.0083
BPA	40005	68.261	0.9989	5	0.0143	0.0361
BPB	39653	100.83	0.9981	5	0.0082	0.0135
BFDGE	34626	394.68	0.9967	5	0.0037	0.0119
BADGE	43449	237.35	0.9988	5	0.0036	0.0139

Tabella 1. Riassunto dei parametri della curva di calibrazione

Analisi di campioni reali

Sono stati analizzati sessantotto campioni di latte di differenti marche, contenuti in diversi tipi di bottiglie di plastica (polietilene tereftalato, PET; polietilene, PE; polietilene alta densità, PEHD, TETRAPAK e TETRABRIK), acquistati in supermarket italiani. I campioni scelti per l'analisi hanno incluso sia latte intero che parzialmente scremato, sia pastorizzato che UHT. I risultati del monitoraggio dei livelli di BPF, BPA, BPB, BFDGE e BADGE nei campioni di latte sono riassunti nella Tabella 2. Venti campioni sono risultati positivi al BPA (29.4%), trenta sei

positivi al BPF (52.9%), sei al BPB (8.8 %), mentre nessun campione ha mostrato positività per BADGE e BFDGE. Inoltre, undici campioni sono risultati positivi sia al BPA che al BPF, mentre cinque sono risultati positivi al BPA, BPB ed al BPF. Dei 68 campioni analizzati, ventisette sono risultati esenti da bisfenoli (39.7%) mentre 41 campioni hanno mostrato positività ad almeno uno dei bisfenoli analizzati (60.3%).

La figura 3 mostra il cromatogramma relativo al campione 61, risultato positivo al BPF, BPA e BPB.

Dallo studio non è emersa nessuna correlazione significativa tra contenuto di grasso nel campione e/o trattamento termico a cui il latte è stato sottoposto e positività ai bisfenoli. Questa osservazione ci suggerisce che la presenza dei bisfenoli nel cibo può essere correlata anche ad altri fattori indipendenti dalle caratteristiche dell'alimento come, ad esempio, la qualità dei materiali con cui il cibo entra in contatto durante il processamento.

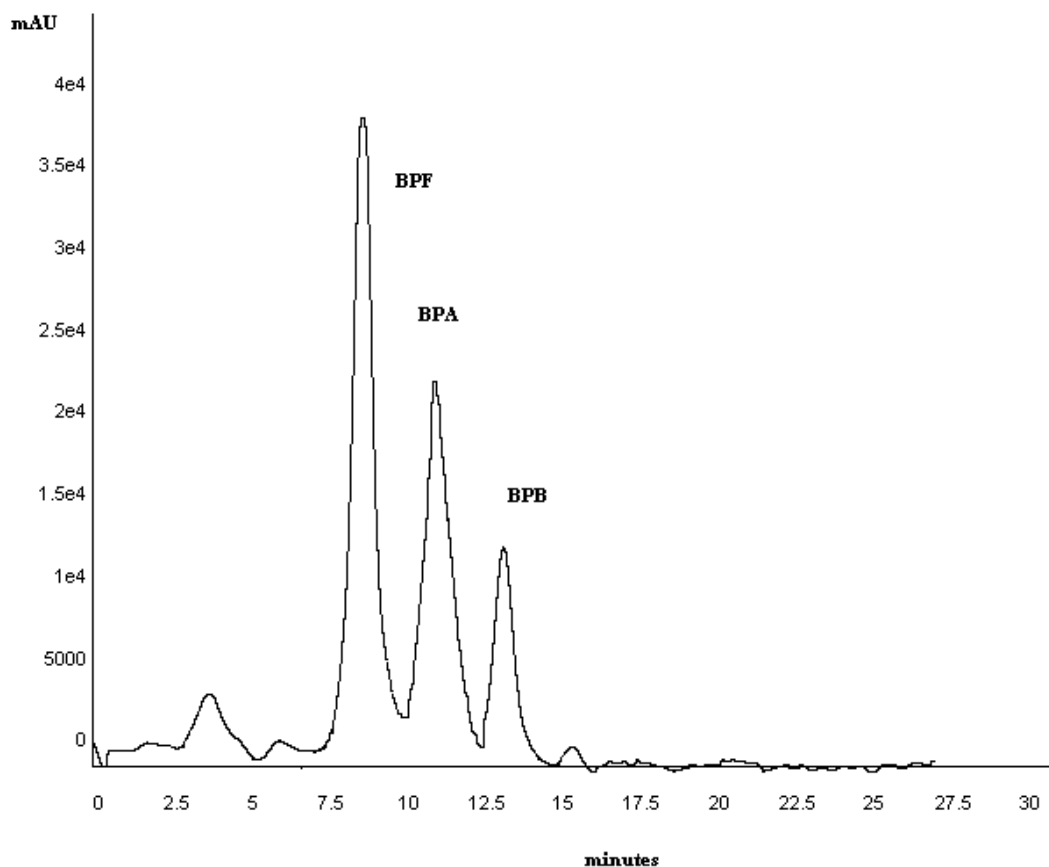


Figura 3. Cromatogramma relativo al Campione 61, positivo al BPA, BPF e BPB

Analisi spettrometrica di massa

Metodi analitici LC/MS per BPA nel latte (Maragou et al. 2006; Mortensen et al: 2005) e per i due diglicidil eteri, BADGE e BFDGE in alimenti inscatolati (Pardo et al. 2006; Biles et al. 1999) sono riportati in letteratura. Ad ogni modo, finora, non è riportato nessun metodo LC/MS per la determinazione simultanea dei cinque bisfenoli (BPA; BPF, BPB; BADGE and BFDGE) nel latte.

Nella figura 4 è mostrato l'overlapping dei cromatogrammi relativi al campione 61, positivo a BPF, BPA e BPB. Le linee rossa, blu, nera, rosa, azzurra e grigia corrispondono rispettivamente ai picchi corrispondenti a m/z 227, 241, 249, 198, 339 and 311.

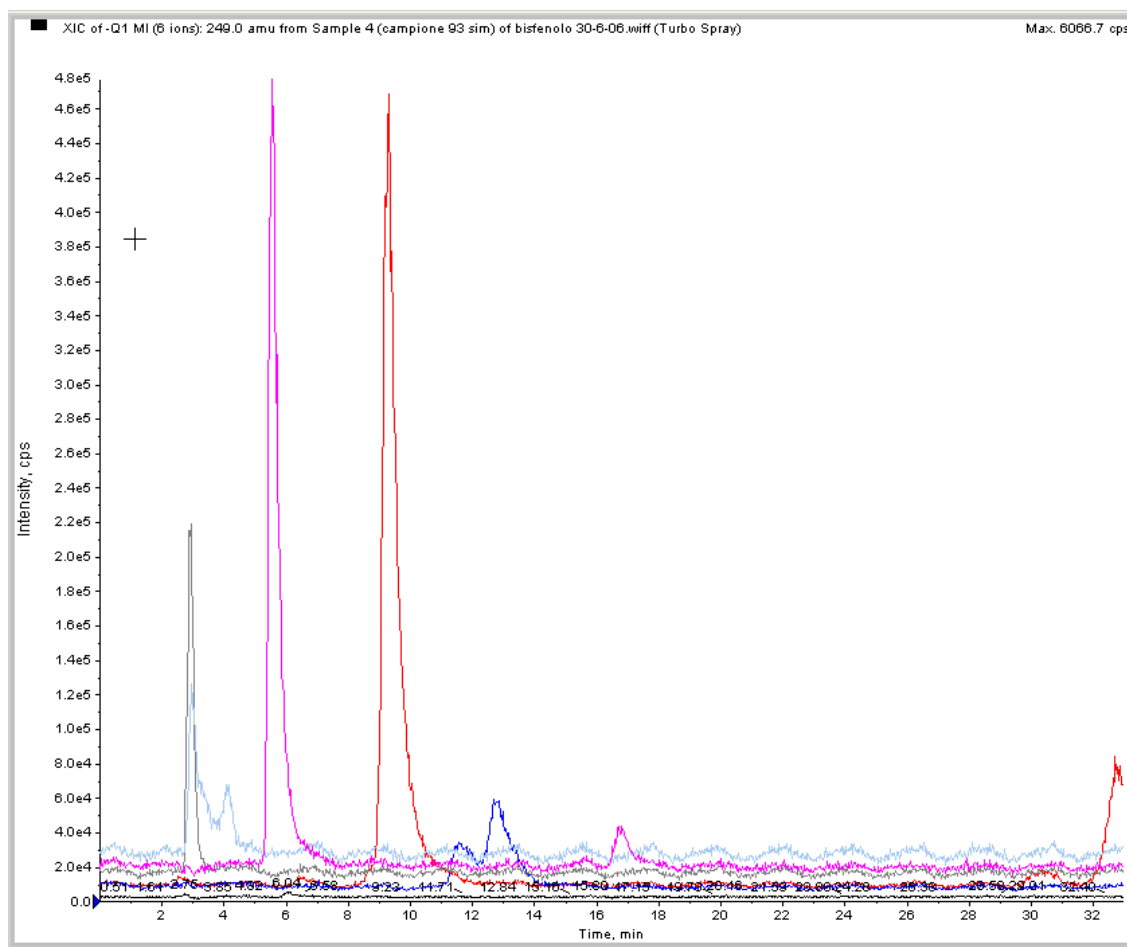


Figura 4. Overlapping dei cromatogrammi relativi al Campione 61

Discussione

La Commissione Europea ha fissato un limite di migrazione specifico (LMS) per il BPA pari a 0.6 mg/kg di alimento (EC 2011) mentre per BADGE ed i suoi derivati è stato stabilito un LMS di 9.0 mg/kg di alimento; l'uso del BFDGE è stato bandito (EC 2005) mentre non esiste nessun limite di migrazione specifico per BPB e BPF. I nostri risultati mostrano che le concentrazioni di bisfenolo nei campioni risultati positivi sono molto al di sotto dell'attuale limite di migrazione specifica imposto dalla Commissione Europea; si potrebbe supporre pertanto che non esista alcun rischio per la salute del consumatore dall'assunzione del cibo sottoposto all'analisi.

Ciò nonostante, è ampiamente risaputo che gli effetti tossici dei Bisfenoli derivano da una esposizione cronica a dosi molto più basse di quelle riportate per

un'esposizione acuta dalle Agenzie che operano nel campo della Sicurezza alimentare. Inoltre, il possibile accumulo di questi composti nel tessuto adiposo amplifica il livello di esposizione, dando vita a persistenti, anche se bassi, livelli sierici (Vom Saal and Welshons 2006); non è da sottovalutare inoltre il possibile effetto sinergico di queste molecole con altri xenoestrogeni o steroidi endogeni, che può incrementare la loro tossicità anche se a livelli inferiori da quelli che costituiscono un pericolo per la salute umana (Rajapakse et al. 2002).

Il nostro studio è stato condotto su campioni di latte confezionato in differenti materiali di imballaggio (polietilene teraftalato, PET; polietilene, PE, polietilene ad alta densità, PHED, TETRAPAK e TETRABRIK). Nonostante queste sostanze non dovrebbero essere ritrovate in tale tipo di matrice, perchè non rientrano nella produzione di tali tipi di materiale, l'ubiquitariet  di tali tipi di contaminanti in tutti i tipi di materiale da imballaggio   confermata ampiamente da dati riportati in letteratura (Casajuana and Lacorte 2005; Casajuana and Lacorte 2004; Guart et al. 2011).

I risultati indicano come tali tipi di materiali siano privi di BADGE e BFDGE, mentre almeno uno degli altri bisfenoli analizzati (BPA, BPF, BPB)   stato ritrovato nella matrice alimentare considerata. In particolare, dei campioni di latte che hanno mostrato positivit  ad almeno uno dei bisfenoli: 17 dei 34 campioni di latte erano in PET, 7 dei 14 campioni erano in TETRAPAK, 8 di 8 campioni erano in PEHD, 7 di 8 campioni erano in TETRABRIK ed, infine, solo 1 di 8 campioni era in PE (Tabella 2).

Un nuovo allarme sulla tossicit  del BPA   sorto e l'EFSA   sempre pi  frequentemente invitata a revisionare il suo parere sull'uso di tale sostanza.

Queste considerazioni indicano l'importanza di un continuo ed accurato monitoraggio sui livelli di queste sostanze in qualsiasi tipo di matrice, includendo anche quelle alimentari (Mariscal-Arcas et al. 2009).

Sample	Milk type ^a	BPA µg/mL,	BPF µg/mL	BPB µg/mL	Kind of package
1	W	-	-	-	PET
2	W	0.4810 ± 0.0320	-	-	PET
3	W UHT	0.0360± 0.002	-	-	TETRAPAK
4	W	-	-	-	PET
5	W	-	< LOQ	-	PET
6	LF UHT	0.5210± 0.0280	< LOQ	-	PET
7	W	-	-	-	PET
8	W UHT	< LOQ	< LOQ	-	PEHD
9	LF UHT	0.0150± 0.0080	< LOQ	-	PEHD
10	W	-	-	0.0160 ± 0.0090	PEHD
11	W	0.0630± 0.0030	0.0060± 0.0004	-	PET
12	W	0.0450± 0.0030	0.0020± 0.0001	-	PET
13	W	-	< LOQ	-	TETRAPAK
14	W UHT	-	< LOQ	-	PEHD
15	W UHT	-	-	-	TETRAPAK
16	LF UHT	-	-	-	PE
17	LF UHT	-	-	-	PET
18	LF UHT	0.0150± 0.0090	-	-	PE
19	LF	-	< LOQ	-	PET
20	W	-	0.002 ± 0.0001	-	PET
21	LF	-	< LOQ	-	PET
22	W UHT	-	-	-	PET
23	LF	-	< LOQ	-	PET
24	W	0.0170± 0.0090	< LOQ	-	TETRAPACK
25	W	-	-	-	PET
26	LF	-	< LOQ	-	PET
27	LF	-	-	-	PET
28	LF UHT	-	0.0020 ± 0.0001	-	TETRABRIK
29	W UHT	-	0.0190 ± 0.0001	-	TETRABRIK
30	W UHT	-	< LOQ	-	TETRABRIK
31	W UHT	-	0.0140 ± 0.001	-	TETRABRIK
32	W UHT	-	< LOQ	-	TETRABRIK
33	LF UHT	-	-	-	TETRABRIK
34	W UHT	-	0.0040± 0.0002	-	TETRABRIK
35	W UHT	-	< LOQ	-	TETRABRIK
36	LF	0.0160± 0.0090	0.0262± 0.0017	-	PET
37	LF UHT	-	-	-	PE
38	LF UHT	-	-	-	PET
39	W	0.0140± 0.0080	0.0021± 0.0001	-	PET
40	W UHT	0.0150± 0.0080	< LOQ	-	TETRAPAK
41	LF	-	-	-	PET
42	W	-	0.0016± 0.0009	-	PET
43	W	-	-	-	PET
44	LF	-	-	-	PET
45	W UHT	-	-	-	TETRAPAK
46	LF UHT	-	-	-	TETRAPAK
47	LF UHT	-	-	-	TETRAPAK
48	LF	-	< LOQ	-	PET
49	W	-	-	-	PET
50	W	-	-	-	PET

51	LF	-	-	-	TETRAPAK-
52	W	-	-	-	TETRAPAK
53	W UHT	-	-	-	TETRAPAK
54	LF UHT	-	0.0066± 0.0004	-	TETRAPAK
55	LF UHT	-	< LOQ	-	TETRAPAK
56	W	-	-	-	PET
57	LF	-	-	-	PET
58	W	-	-	-	PET
59	W UHT	-	< LOQ	-	TETRAPAK
60	LF	-	-	-	PET
61	LF	0.0880± 0.0040	0.0190 ± 0.0011	0.0160± 0.0090	PET
62	W	< LOQ	< LOQ	< LOQ	PET
63	LF	< LOQ	< LOQ	-	PET
64	LF UHT	0.0620± 0.0040	0.0083 ± 0.0005	< LOQ	PEHD
65	LF UHT	0.0620± 0.0040	< LOQ	< LOQ	PEHD
66	LF UHT	< LOQ	< LOQ	-	PEHD
67	LF UHT	0.0730± 0.0040	0.0100 ± 0.0007	0.0670± 0.0040	PEHD
68	LF	0.1700± 0.0900	-	-	PET

^a W : Whole; LF: Low Fat; W UHT: Whole UHT; LF UHT; Low Fat UHT

Tabella 2. I dati sono espressi come media ± deviazione standard di tre replicati di campioni di latte di tre diverse bottiglie della stessa marca con uguale numero di lotto

Conclusioni

Il materiale da imballaggio è un'importante fonte per gli esseri umani di EDCs a causa della migrazione di queste sostanze dall'imballaggio all'alimento. Il nostro studio riporta uno screening sulla presenza di BPA, BADGE, BPF, BFDGE, BPB, nel latte, un'alimento largamente usato. Nonostante i livelli di bisfenolo determinati siano tutti al di sotto degli attuali limiti imposti, essi possono contribuire significativamente al raggiungimento della dose tollerabile giornaliera, considerando la quantità apportata dai singoli alimenti.

Il metodo analitico messo a punto è rapido, semplice ed efficiente consentendo di determinare i livelli dei cinque bisfenoli studiati a valori di concentrazione inferiori rispetto a quelli fissati dalla Commissione Europea.

2.5.2 Valutazione del rilascio di bisfenoli da biberon in polieteresulfone

2.5.2.1 BPA e Biberon

Il problema del rilascio di BPA da biberon è venuto alla ribalta quando il governo Canadese, completata la valutazione del rischio sul BPA e in consultazione con le industrie, ha annunciato, nel mese di aprile del 2008 di bandire l'importazione, la vendita e la pubblicità di biberon in polycarbonato. La decisione del governo Canadese si è basata su studi recenti riguardanti la valutazione del rischio correlato all'ingestione di BPA in particolare nel caso di neonati e bambini fino a 18 mesi. Sebbene da tali studi fosse risultato che l'esposizione al BPA fosse al di sotto dei livelli di rischio attualmente previsti, il governo Canadese ha preferito adottare elevate misure precauzionali trattandosi di soggetti particolarmente a rischio (Rano 2008). Il passo successivo per il Canada sarà far sì che il BPA venga introdotto nella lista di sostanze tossiche. La decisione del governo Canadese ha indotto la Food and Drug Administration (FDA) statunitense a diffondere un comunicato in cui sono elencati i rischi per la salute correlati alla presenza di bisfenolo A (BPA) in alcuni recipienti di plastica per alimenti. Precedentemente la stessa FDA non aveva adottato provvedimenti restrittivi nonostante la pubblicazione di studi che avanzavano riserve sulla presenza del BPA nel cibo. Il motivo della nuova posizione adottata dalla FDA è legato ai risultati di nuovi studi tossicologici realizzati negli USA dall'Istituto Nazionale della Salute (NIH), condotti per indagare sui nuovi potenziali effetti dannosi del bisfenolo A, sul cervello, sul feto e sui bambini. Inoltre l'FDA s'è dichiarata d'accordo sull'iniziativa, già adottata spontaneamente da diverse aziende americane, di non usare più BPA per la produzione dei biberon.

Per quanto riguarda la situazione in Europa, dobbiamo ricordare che nel 1984 l'SCF (Scientific Committee on Food) si era espresso favorevolmente circa l'utilizzo

del BPA in materiali plastici a contatto con il cibo, e aveva fissato una TDI di 0,05 mg/Kg b.w./day, sulla base di studi a lungo termine e a 90 giorni in ratti e topi, somministrando il BPA con la dieta. Nel 2002 alla luce di nuove ricerche condotte a 90 giorni su ratti, era stato fissato un nuovo valore per la TDI espresso come t-TDI (temporary-TDI) tale valore era pari a 0,01 mg/Kg b.w./day.

Tale valore era stato poi riportato nuovamente a 0,05 mg/Kg b.w./day, nel 2006 basandosi su una NOAEL di 5 mg/Kg b.w./day

Nel settembre 2008 la Commissione Europea ha chiesto all'EFSA di valutare le conclusioni di uno studio di Lang *et al.* pubblicato nel *Journal of the American Medical Association* (JAMA, 16 settembre 2008), in cui si suggeriva l'esistenza di un collegamento tra aumento dei livelli di BPA urinario e una maggiore incidenza di patologie gravi, tra cui cardiopatie e diabete. A tal proposito l'EFSA ha osservato che lo studio non contiene informazioni sull'esposizione a lungo termine al BPA, che sarebbero importanti per stabilire una correlazione tra il BPA e lo sviluppo delle patologie croniche in questione. L'EFSA ha ritenuto che lo studio non fornisse prove sufficienti di un nesso causale tra il BPA e tali patologie e pertanto non ha ritenuto di dover mettere in discussione la TDI già fissata.

Il 15 ottobre 2009 l'EFSA ha ricevuto dalla Commissione Europea una richiesta di valutare l'importanza di un nuovo studio sui possibili danni neuroevolutivi del BPA e, se necessario, di aggiornare l'attuale TDI (dose giornaliera tollerabile). Lo studio in questione era stato commissionato dall'*American Chemistry Council* in risposta ai timori sulla sicurezza della sostanza, sollevati dal governo canadese che ha introdotto norme per mettere al bando l'uso del policarbonato nei biberon.

Sempre sull'argomento, l'8 marzo 2010 l'EFSA ha ricevuto dalla Commissione Europea un'ulteriore richiesta di prendere in considerazione, al fine della valutazione del rischio, anche qualsiasi altra evidenza scientifica disponibile e di

tenersi a stretto contatto in merito con gli organismi di valutazione del rischio degli Stati membri dell'Unione Europea.

Il 30 marzo 2010 l'EFSA ha ricevuto una richiesta urgente dalla Commissione europea di vagliare le motivazioni scientifiche fornite dalla Danimarca a supporto della decisione del governo di mettere al bando l'uso del BPA nei materiali a contatto con gli alimenti per i bambini in età compresa tra 0 e 3 anni. La valutazione del rischio danese si basava essenzialmente sullo studio di Stump (2009), che aveva osservato possibili effetti neuroevolutivi del BPA a varie dosi. L'EFSA ha risposto alla Commissione chiarendo semplicemente che tale studio era in quel momento sottoposto al vaglio.

L'EFSA ha aggiornato il proprio parere scientifico sul BPA a settembre del 2010. A seguito di una dettagliata ed esaustiva disamina delle recenti pubblicazioni scientifiche e degli studi sulla tossicità del BPA a basse dosi, gli scienziati hanno concluso di non essere riusciti a individuare alcuna nuova prova che li inducesse a rivedere l'attuale TDI per il BPA di 0,05 mg/Kg b.w/day stabilita dall'EFSA nel suo parere del 2006 e riconfermata nel parere del 2008. Il gruppo di esperti ha, inoltre, dichiarato che i dati attualmente disponibili non forniscono prove convincenti sulla tossicità del BPA a livello neuro comportamentale (EFSA 2010).

Attualmente la Comunità Europea ha vietato, con la direttiva 2011/8/UE della commissione del 28 gennaio 2011, a partire dal 1° marzo 2011 l'utilizzo del BPA per la fabbricazione di biberon in polycarbonato per lattanti e a partire dal 1° giugno dello stesso anno l'immissione sul mercato e l'importazione nell'Unione Europea di materiali e oggetti in materiale plastico destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari che non sono conformi a tale direttiva (GU 2011).

In Italia già da un po' di tempo le aziende leader nella vendita di prodotti per l'infanzia hanno affiancato ai biberon in polycarbonato (con BPA) biberon prodotti utilizzando il polimero PES (polieteresulfone) etichettandolo come BPA free.

2.5.2.2 **Bambini: categoria a rischio**

Sicuramente una delle categorie più a rischio è certamente quella dei bambini. Sulla base dei livelli ambientali è stato stimato che nonostante le sorgenti di contaminazione possano essere diverse, il 99% dell'esposizione deriva fondamentalmente dalla dieta. Infatti, per i bambini l'intake giornaliero derivante dagli alimenti è di 52-74 ng/Kg/day, mentre 0,24-0,41 ng/Kg/day derivano dall'inalazione. Fino ai tre mesi di età, il contatto con il BPA attraverso il cibo avviene per ingestione del latte posto a contatto con i biberon dai quali il BPA può essere rilasciato a livelli variabili in funzione delle condizioni d'uso (tipo di riscaldamento, lavaggio). Un punto critico è che l'ingresso per via orale de BPA nell'organismo implica il metabolismo di primo passaggio epatico e si sa bene che i neonati presentano un capacità metabolica limitata per il BPA e altri distruttori endocrini; pertanto studi di farmacocinetica basati sull'esposizione orale degli adulti non possono essere utilizzati per predire la farmacocinetica in feti, neonati o bambini in quanto "i bambini non sono piccoli adulti" (Calamandrei G et al. 2009)

2.5.2.3 Parte Sperimentale

Lo studio per la valutazione del rilascio di bisfenoli ha riguardato biberon in PES di tre aziende leader nel settore della produzione di prodotti per l'infanzia.

Il rilascio è stato valutato in campioni di latte riscaldati all'interno dei biberon in esame utilizzando tecniche di riscaldamento diverse. Per ogni marca il rilascio è stato valutato su biberon appartenenti a due lotti diversi e per ogni lotto sono stati analizzati tre biberon; inoltre ciascun campione di latte è stato analizzato in duplicato (Figura 1).

Le tecniche di riscaldamento utilizzate sono quelle più comunemente impiegate in ambito domestico:

riscaldamento in scaldabiberon;

riscaldamento in microonde;

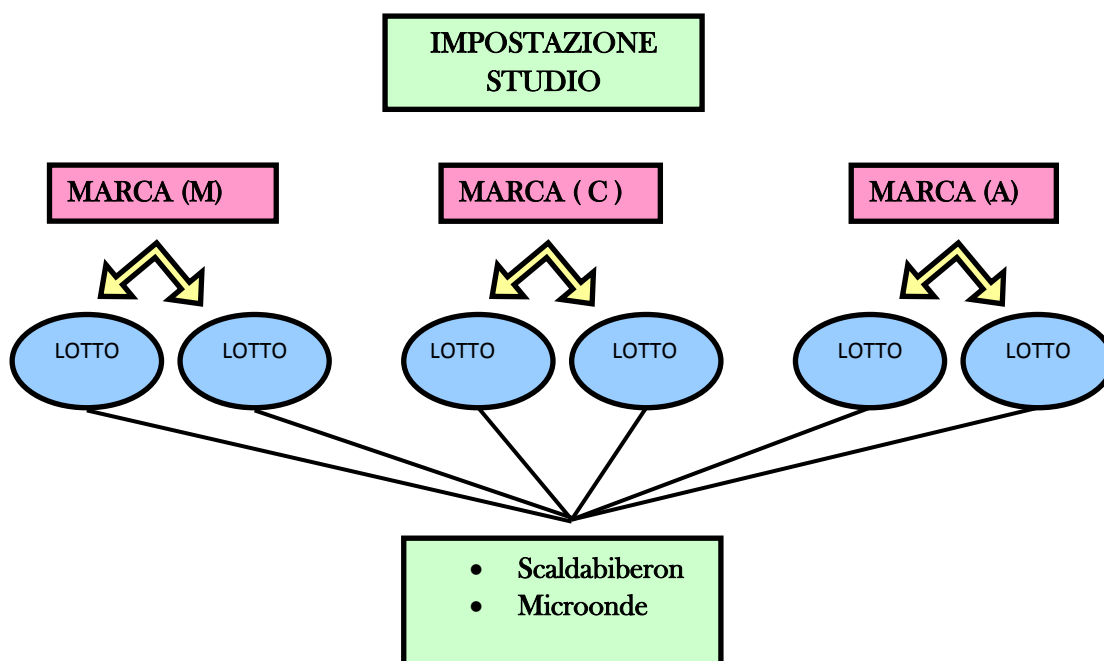


Figura 1. Schema di impostazione dello studio

Preparazione del campione

La procedura di riscaldamento mediante scaldabiberon è stata realizzata riempiendo di latte i biberon da sottoporre all'analisi e ponendoli all'interno dello scaldabiberon riempito con acqua. Il riscaldamento è stato protratto fino a quando il latte non ha raggiunto la temperatura di 80° C dopo di che il latte è stato lasciato raffreddare fino a temperatura ambiente prima di procedere all'analisi.

La procedura di riscaldamento con microonde ha previsto l'utilizzo di un comune forno a microonde, settato alla potenza massima, per riscaldare il latte fino alla temperatura di 80°C; nelle condizioni descritte la temperatura desiderata è raggiunta in meno di un minuto. Successivamente, il latte è stato fatto raffreddare fino a temperatura ambiente.

Nello studio è stato impiegato latte proveniente direttamente da un allevamento e, comunque, preventivamente testato per verificare che non contenesse bisfenoli.

La valutazione dei livelli di BPA e BPS nel latte, posto a contatto con i biberon, è stata eseguita con una procedura analitica precedentemente messa a punto e validata nel nostro laboratorio, che ha previsto una prima fase di estrazione e concentrazione degli analiti, mediante estrazione in fase solida (SPE), ed una loro successiva analisi qualitativa e quantitativa mediante cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC con rivelatore fluorimetrico (FD), secondo quanto riportato nella sezione *Preparazione del campione ed Estrazione su fase solida (SPE)* e nella sezione *Analisi HPLC (da pag. 57-59)*.

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato. Per verificare l'assenza di picchi relativi a sostanze interferenti sono stati utilizzati, come prove in bianco, campioni di latte, previamente testati, per verificare l'assenza di bisfenoli.

I tempi di ritenzione (t_R) dei due bisfenoli, ottenuti mediante iniezione degli standard, sono risultati i seguenti :

BPA 11.31 ± 0.40 min;

BPS 7.20 ± 0.30 min

Il cromatogramma relativo ai due analiti è riportato in Figura 2.

Validazione del metodo

I parametri utilizzati per la validazione del metodo sono stati i seguenti:

recuperi;

LOD e LOQ;

coefficiente di determinazione;

precisione: ripetibilità e precisione intermedia;

Per la validazione del metodo si è proceduto come descritto nei paragrafi successivi.

Recuperi

I recuperi sono calcolati aggiungendo al latte una concentrazione nota di analita per poi verificare la quota recuperata, dopo aver sottoposto il campione al processo di estrazione; il completo recupero dell'analita è garanzia dell'efficienza del metodo analitico. Nel caso del BPA e del BPS, sono stati preparati tre livelli di arricchimento a concentrazione finale 0.015-0.150-300 µg/mL.

Per gli analiti oggetto del nostro studio si sono ottenuti i seguenti recuperi:

BPS = 98%; BPA= 106%;

LOD e LOQ

Il LOD è la più bassa concentrazione di analita in un campione che può essere rivelata nelle condizioni di saggio, ma non necessariamente quantificata. Si valuta con soluzioni standard a concentrazioni sempre minori e si raggiunge quando il segnale dell'analita d'interesse diventa uguale a quello del bianco. Il LOQ è la più

bassa concentrazione di analita in un campione, che può essere determinata con accettabile precisione ed accuratezza nelle condizioni di saggio.

Il limite di rivelazione (LOD) della procedura analitica è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$LOD = 3,3 \delta_b/b$, dove δ_b è la deviazione standard del bianco e b è la pendenza della retta.

Il limite di quantizzazione (LOQ) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$LOQ = 10 \delta_b/b$.

I valori del LOD e del LOQ per gli analiti oggetto del nostro studio sono stati i seguenti:

BPS: LOD = 0.002 µg/mL; LOQ = 0.006 µg/mL;

BPA: LOD = 0,0013 ug/mL; LOQ = 0,0045 ug/mL

Precisione

La precisione viene misurata in termini di ripetibilità e precisione intermedia del metodo. Questi due parametri sono stati valutati eseguendo cinque analisi replicate nello stesso giorno (ripetibilità intra-day) e in dieci giorni differenti (precisione intermedia inter-day).

La deviazione standard relativa intra-day è risultata essere pari allo 0.07% mentre quella inter-day è risultata pari allo 3.20% per il BPS; invece per il BPA la deviazione standard intra-day è risultata pari allo 0,05% mentre quella inter-day 3,06%.

Coefficiente di determinazione (R^2)

In statistica questo parametro rappresenta un indice di correlazione tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato; R^2 varia tra 0 e 1, in particolare quando è pari a zero il modello sperimentale usato non spiega per nulla i dati, quando è invece pari ad uno il modello spiega perfettamente i dati. Nel nostro caso, il coefficiente di determinazione del BPS è risultato pari a 0.9998, come si evince dalla retta di calibrazione. Per la costruzione della retta di calibrazione necessaria per la determinazione quantitativa degli analiti, per il BPS sono state usate soluzioni standard a cinque livelli di concentrazione comprese nell'intervallo 0.006-0.5 µg/ml. Per il BPA la retta è stata costruita utilizzando cinque concentrazioni comprese nell'intervallo 0.0045-0.5 µg/mL ed il coefficiente di correlazione è risultato pari a 0,9995. Le rette di calibrazione sono state costruite correlando l'area del picco cromatografico con la concentrazione nota della soluzione di standard iniettata. Ogni valore della curva è la media di tre iniezioni.

I parametri di validazione del metodo sono riportati in Tabella 1.

PARAMETRI VALIDAZIONE	BPA	BPS
RECUPERI	106%	98%
LOQ	0,0045 µg/ml	0,006 µg/ml
LOD	0,00135 µg/ml	0,002 µg/ml
R^2	0,9985	0,9998
Ripetibilità (intra-day) (n=5)	0,05%	0,07%
Precisione intermedia (precisione inter-day) (n=10)	3,06%	3,20%

Tabella 1: Tabella riassuntiva dei parametri di validazione del metodo

Risultati

Nella figura 2 è riportato un cromatogramma degli standard di BPA e BPS nelle condizioni di analisi HPLC.

I risultati della valutazione del rilascio di BPA e BPS da biberon in PES delle tre aziende prese in esame sono riportati nella Tabella 2.

Il nostro studio ha evidenziato che in una sola delle tre aziende non si è avuto rilascio di bisfenoli né a seguito di riscaldamento con scaldabiberon né con microonde. Inoltre risulta che da biberon in polietereosulfone (PES) di una delle tre aziende si è avuto rilascio di bisfenolo A a seguito di riscaldamento con forno a microonde (i livelli oscillano in un range tra 0.0054-0.0064 µg/mL). L'analisi dei biberon dell'azienda M ha evidenziato, invece, il rilascio di BPA solo in seguito a riscaldamento mediante scaldabiberon (i livelli variano in un range tra 0.0138-0.0232 µg/mL).

Marca/lotto	Scaldabiberon	Microonde
M/1	BPA0,0138ug/mL	/
M/2	BPA0,0232ug/mL	/
C/1	/	BPA0,0054ug/mL
C/2	/	BPA0,0064ug/mL
A/1	/	/
A/2	/	/

Tabella 2. Risultati ottenuti dai biberon in PES..

Bisogna tener presente che per raggiungere la temperatura di 80°C, alla quale è stato riscaldato il latte per l'analisi, il riscaldamento si è dovuto protrarre per circa ½

ora contro il minuto richiesto dal riscaldamento con microonde. E' possibile, quindi, che in funzione della composizione del polimero con cui è stato prodotto il biberon, e quindi anche dello stato in cui si trovano i monomeri liberi all'interno del polimero, i fattori che possono influenzare il rilascio dei residui monomerici nell'alimento, e cioè tempo di contatto tra latte e biberon e metodica di riscaldamento (è noto che le microonde facilitano l'estrazione di analiti da una matrice), possano avere effetti diversi sul fenomeno di migrazione.

Nella figura 3 è riportato un cromatogramma relativo ad un campione reale risultato positivo al BPA.

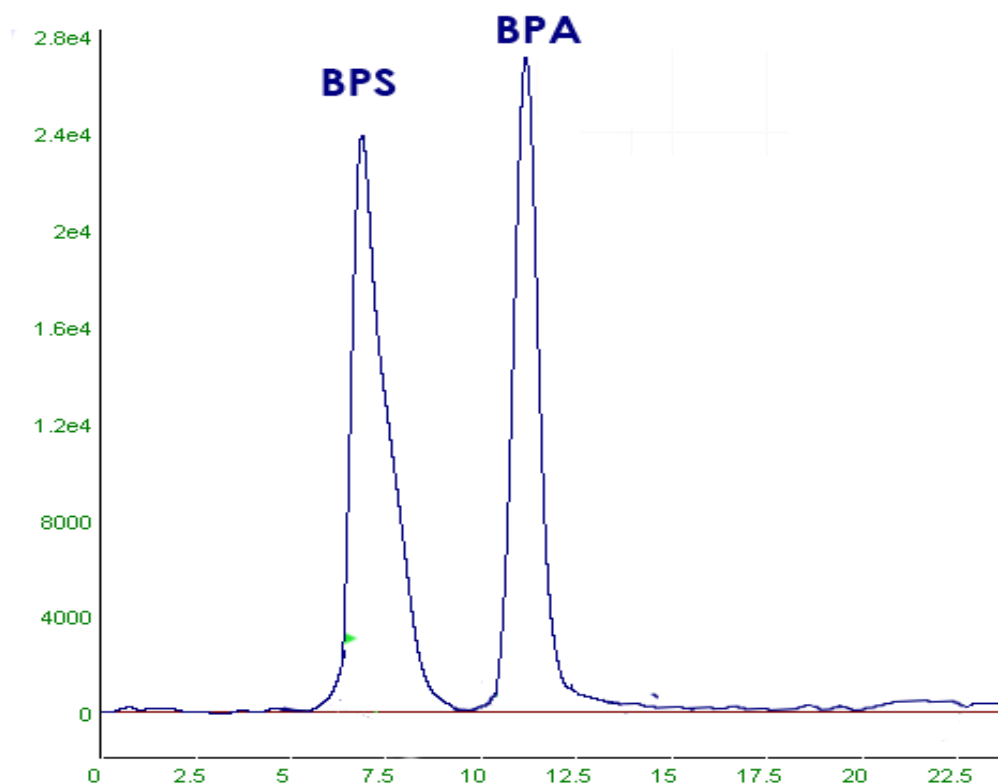


Figura 2. Cromatogramma di una soluzione standard di BPA e BPS a concentrazione 0.05 µg/L

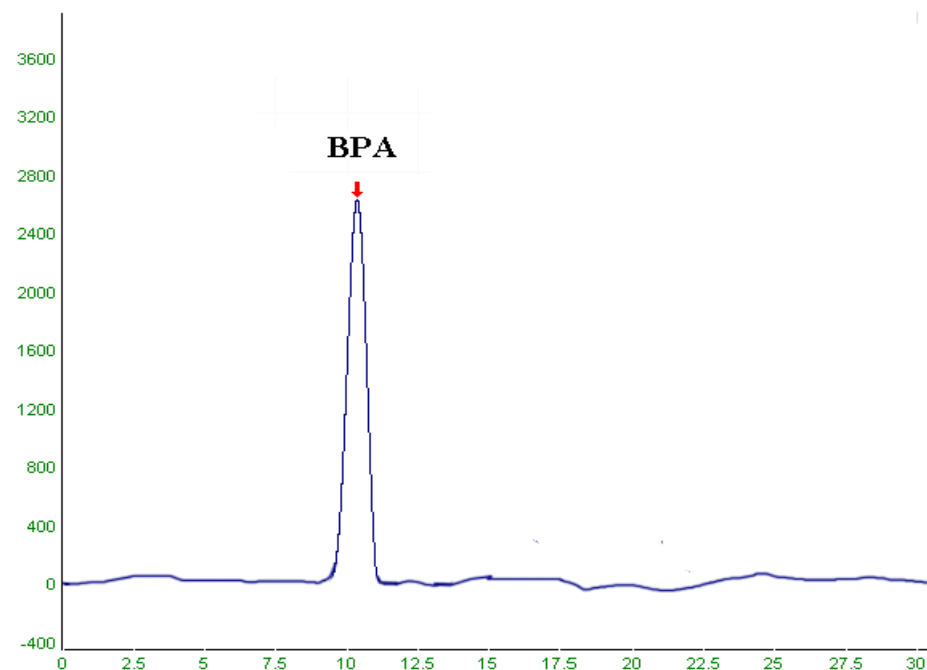


Figura 3. Cromatogramma di un campione reale di latte positivo al BPA in biberon in PES

I risultati dell'analisi della variabilità tra i lotti, mostrati nei grafici delle Figure 4 e 5, indicano che esistono differenze di comportamento, relativamente alla migrazione, anche tra biberon prodotti dalla stessa azienda ma appartenenti a lotti diversi.

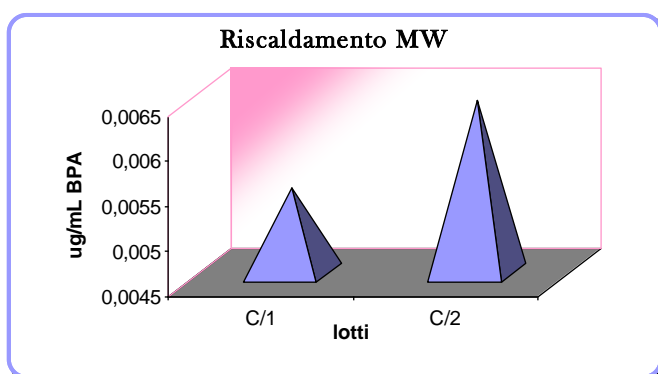


Figura 4. Grafico che mostra le concentrazioni di BPA nei lotti 1 e 2 della medesima marca C a seguito di riscaldamento con microonde

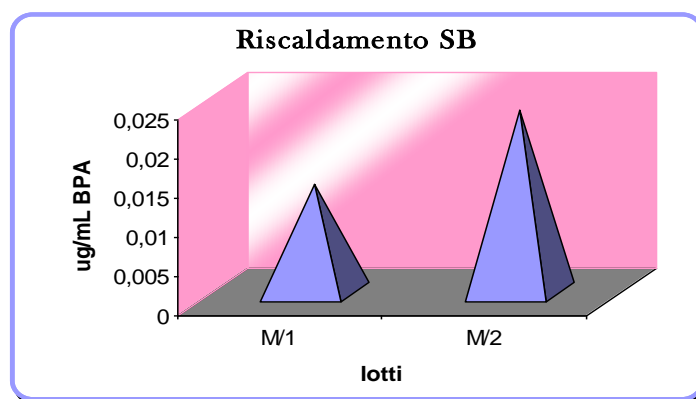


Figura 5. Grafico che mostra le concentrazioni di BPA nei lotti 1 e 2 della medesima marca M a seguito di riscaldamento con scaldabiberon

Conclusioni

Il rilascio dei bisfenoli da contenitori per alimenti può essere messa in relazione alla presenza di monomeri liberi all'interno del materiale polimerico dovuta a cause diverse, ossia, ad un incompleto processo di polimerizzazione o ad un processo di "lavaggio" del polimero, successivamente alla sintesi, eseguito non correttamente così da non allontanare completamente i residui dei reagenti usati per la sintesi. L'analisi della variabilità tra i lotti conferma che i processi industriali per la sintesi dei polimeri possono avere una forte influenza sul rilascio di bisfenoli dai contenitori. Purtroppo, a tutt'oggi, non esistono normative che obblighino le aziende all'uniformità dei lotti, ed inoltre le certificazioni volontarie sulla standardizzazione della qualità non sono ancora di larga diffusione.

Esistono comunque anche fattori che possono influenzare il rilascio di contaminanti dai biberon nella fase di utilizzo degli stessi e che sono rappresentati da usura nel tempo o condizioni d'uso particolari quali riscaldamento, ebollizione, la presenza di graffi.

2.5.3 Sviluppo e validazione di un metodo analitico per il monitoraggio simultaneo dei livelli di bisfenoli in pomodori in scatola

Lo scopo del seguente lavoro è stato lo sviluppo e la validazione di un metodo analitico per la determinazione simultanea dei livelli di cinque bisfenoli - BPA, BPB, BPF, BADGE e BFDGE - in pomodori in scatola.

E' stato dimostrato che il BPA è in grado di essere rilasciato dalla resina epossidica, utilizzata al fine di prevenire la corrosione e la migrazione dei metalli negli alimenti durante il riscaldamento e la conservazione, nell'alimento (Grumetto et al. 2008; Nerin et al. 2003; Brede et al. 2003; Biles et al. 1997; Munguía-Lopez et al. 2001), e questo potrebbe avvenire anche per gli altri congeneri che vengono utilizzati nella manifattura di tali rivestimenti interni spesso come additivi (Sun et al. 2006; Braunrath et al. 2005a; Braunrath et al. 2005b).

La scelta della matrice è data dall'evidenza che i pomodori in scatola potrebbero rappresentare una non trascurabile fonte quotidiana di bisfenoli a causa del loro largo consumo, dato che rientrano nella preparazione di numerosi piatti in ogni parte del mondo.

Lo sviluppo del metodo ha previsto la messa a punto di un processo estrattivo che garantisse buoni recuperi per tutti i cinque analiti dalla matrice alimentare selezionata ed un'analisi quali quantitativa attraverso HPLC-FD. La validazione ha prodotto ottimi risultati.

Il metodo semplice e veloce può essere utilizzato per analisi di routine che prevedano il monitoraggio dei livelli di bisfenoli analizzati nella matrice presa in considerazione.

2.5.3.1 Parte Sperimentale

Preparazione del campione ed Estrazione su fase solida (SPE)

Le analisi sono state condotte come di seguito riportato:

l'intero contenuto è stato omogeneizzato attraverso l'uso di un high speed blender 7011 Waring con bicchiere in acciaio 316 compatibile con analisi alimentari ed un'aliquota (0,6 g) è stata prelevata per sottoporla alla fase di estrazione. La restante parte omogeneizzata è conservata -20 °C per eventuali successive analisi.

A 0.6 g di matrice sono addizionati 10 mL di ACN. Dopo agitazione magnetica, mantenuta per 20 minuti, il surnatante, è recuperato e diluito fino al volume finale di 100 mL con acqua deionizzata.

La soluzione così ottenuta è sottoposta ad una procedura di clean up attraverso l'utilizzo di una colonnina SPE C₁₈ (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Le colonnine sono state condizionate ed equilibrate con 5 mL di acetonitrile e 5 mL di acqua deionizzata.

Il campione è stato caricato su cartuccia e, quindi, si è proceduto al lavaggio con 20 mL di una miscela acqua/acetonitrile 80:20 (v/v). Sia il caricamento del campione che il lavaggio della colonnina sono stati effettuati sotto vuoto. Dopo il lavaggio, la cartuccia è stata asciugata sotto vuoto per 15 minuti e poi per altri 3 minuti mediante flusso di azoto.

Gli analiti sono stati eluiti con 5 mL di acetonitrile a caduta libera. L'eluato ottenuto è stato successivamente sottoposto ad analisi mediante HPLC.

Campioni di controllo sono stati preparati addizionando gli standard puri dei cinque bisfenoli al pomodoro in bottiglia di vetro, previamente testato per verificare

l'assenza degli analiti in esame, al fine di ottenere tre livelli di arricchimento (25.0, 125.0, 350 $\mu\text{g/kg}$).

Al fine di evitare il possibile rilascio di bisfenoli da materiale in plastica, tutte le attrezzature utilizzate nella fase di preparazione del campione erano in vetro.

Analisi HPLC

Per l'analisi dei campioni all'HPLC è stato utilizzato un cromatografo LC-10AD VP (Shimadzu- Corporation, Kyoto, Japan), munito di loop da 20 μL , ed è stata adoperata una colonna a fase inversa Synergi 4 μ -Fusion RP80A (250 x 4,60 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, CA) munita di una pre-colonna a fase inversa Synergi 4 μ . Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile/acqua 60:40 (v/v). Le analisi sono state effettuate a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) ad un flusso di 0.5 mL/min. Come sistema rivelatore è stato utilizzato un detector a fluorescenza (Waters 470) settato ad una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 273 nm e ad una lunghezza d'onda d'emissione di 300 nm.

I segnali provenienti dal rivelatore sono stati registrati utilizzando il programma Chromatoplus 2007 (Shimadzu-Corporation, Kyoto, Japan). Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

Campioni di pomodoro, provenienti da bottiglie di vetro, previamente testati per verificare l'assenza degli analiti in esame, sono stati assunti come bianco ed usati sia per verificare l'assenza di picchi interferenti e sia, dopo arricchimento, per confermare l'identità dei picchi e definire i parametri di validazione.

Sotto le condizioni sperimentali citate, i tempi di ritenzione (t_r) dei cinque bisfenoli analizzati sono stati: BPF 8.50 ± 0.30 min, BPA 11.31 ± 0.40 min, BPB 13.41 ± 0.40 min, BFDGE 21.50 ± 0.30 , BADGE 31.05 ± 0.30 min. L'analisi quantitativa dei bisfenoli è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard interno che ci ha permesso di costruire una curva di calibrazione per ciascuno dei cinque analiti

correlando l'area del picco cromatografico, ottenuta dopo ogni iniezione degli standard, con la rispettiva concentrazione ($\mu\text{g/mL}$). La curva di calibrazione è stata ottenuta dall'analisi dei campioni di controllo arricchiti di ciascun bisfenolo a cinque differenti livelli di concentrazione compresi tra 0.025 e 0.50 $\mu\text{g/mL}$, a seconda dell'analita. 60 μL di ciascun standard, ossia tre volte il volume del loop, sono stati iniettati nel sistema HPLC ed il segnale del FD è stato registrato. Nell'intervallo di concentrazione considerato, è stata osservata una forte correlazione per tutti i bisfenoli analizzati (BPF, BPA, BPB, BFDGE, BADGE) con il detector a fluorescenza. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard di tre replicati.

Disegno sperimentale di validazione

Con lo scopo di validare il metodo analitico, due tipi di soluzioni sono state preparate in maniera indipendente: le soluzioni di standard per la costruzione delle rette di calibrazione e le soluzioni di standard per la validazione.

Le soluzioni di standard per la costruzione delle rette di calibrazione sono soluzioni in acetonitrile preparate in concentrazioni note dell'analita di interesse; sono state usate per la valutazione dei parametri di calibrazione.

Gli standard per la validazione sono costituiti da estratti degli analiti dalla matrice. La matrice arricchita dagli analiti, in quantità note, è stata sottoposta alla procedura di estrazione; gli estratti in acetonitrile, a concentrazioni intermedia rispetto a quelle usate nella calibrazione, sono state utilizzate per la validazione del metodo.

La validazione del metodo è stato condotto per dieci giorni testando i seguenti criteri: linearità, precisione (repetibilità e precisione intermedia), accuratezza, limite di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) e recuperi.

Standard di Calibrazione

Le soluzioni stock dei cinque bisfenoli (soluzioni stock degli standard per la calibrazione) sono state preparate singolarmente in acetonitrile ad una concentrazione di 10 µg/mL e conservate a 0°C. Cinque soluzioni (n=5), a differente concentrazione, sono state preparate aggiungendo una certa quantità di ciascun analita, prelevato dalle singole soluzioni stock, ad un determinato volume di acetonitrile. I livelli di concentrazione utilizzati per la costruzione della curva di calibrazione sono risultati compresi tra 0.025 µg/mL e 0.5 µg/mL.

Ciascuna soluzione è stata analizzata in triplicato.

Standard di Validazione.

Per gli standard di validazione, è stata preparata una soluzione stock dei cinque bisfenoli a concentrazione 1 µg/ml in acetonitrile. Dalla soluzione stock è stato prelevato, ed aggiunto alla matrice, un volume di ciascun analita tale da ottenere estratti a 3 livelli di arricchimento (25, 125 e 350 µg/kg). Gli estratti in acetonitrile sono stati analizzati in triplicato per 10 giorni.

Valutazione dell'andamento dell'estrazione

Per valutare l'esaustività del processo estrattivo, e calcolare i recuperi, la procedura è stata applicata dopo l'aggiunta di 15 ng, 75 ng, 210 ng, di standard puri ai 0.6 g di matrice pomodoro.

Ciascuna estrazione è stata ripetuta tre volte (per un totale di dodici estrazioni, incluse le analisi in triplicato del campione di controllo, rappresentato dal pomodoro senza l'aggiunta degli standard). Ciascun estratto è stato analizzato in triplicato.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato usato un pacchetto commerciale per analisi statistiche (Microsoft Excel 2007). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

Risultati e discussione

Ottimizzazione delle condizioni SPE ed analisi cromatografica

In un precedente lavoro era stato sviluppato un metodo per la determinazione simultanea di BPA e BPB in pomodori pelati in scatola. In una prima fase del lavoro, quindi, si è cercato di capire se il metodo, già validato, potesse essere applicato in maniera soddisfacente all'analisi dei cinque analiti, garantendo l'ottenimento di buoni risultati nonostante la presenza di più composti (Grumetto et al. 2008). Il metodo estrattivo e di isolamento degli analiti prevedeva l'uso in combinazione di due colonnine, SPE C18 e Florisil. Precedentemente alla fase di carico sulla C18 e, successivamente, sulla Florisil, erano previste fasi di allontanamento del solvente in evaporatore rotante a 40°C.

Il metodo forniva buoni recuperi per tutti i bisfenoli (BPA, BPB e BPF) fatta eccezione per i due diglicidil eteri (BADGE e BFDGE). E' stata ipotizzata una perdita dei due analiti, nel corso del processo di estrazione, probabilmente dovuta a fenomeni di degradazione in seguito al riscaldamento per l'allontanamento dei solventi utilizzati nella fase estrattiva. Il metodo è stato, pertanto, modificato e semplificato al fine di ottenere buoni recuperi di tutti gli analiti esaminati.

In questa fase sono state testate pertanto diverse procedure estrattive degli analiti dalla matrice che hanno richiesto l'uso di diversi tipi di colonnine SPE (Florisil™, ChemElut™, Oasis HLB, Extrelut™, C18 Chromabond™), separatamente o in combinazione, cercando di evitare processi di riscaldamento al fine di preservare l'integrità della funzione epossidica di BADGE e BFDGE.

I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando un unico step di purificazione del campione su colonnina SPE C18 Chromabond™, previa estrazione degli analiti dalla matrice con acetonitrile. Inoltre la procedura si è dimostrata efficace nel ridurre sostanzialmente le interferenze date dai composti più polari che eluiscono al fronte della corsa cromatografica, a volte così abbondanti nella matrice cruda da

interferire con l'analisi dei bisfenoli. La procedura ci ha inoltre permesso di ottenere buoni recuperi degli analiti, valutati su campioni di controllo arricchiti delle soluzioni di standard.

Le analisi qualitative sono state condotte per comparazione dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nei campioni arricchiti con quelli osservati per BPF, BPA, BPB, BFDGE e BADGE, standard puri, eluiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Per l'analisi quantitativa, le procedure di calibrazione sono state effettuate su soluzioni standard dei cinque bisfenoli, iniettate tre volte nello stesso giorno, e ripetute ogni due settimane; in questo periodo il coefficiente di variazione (CV) è risultato $< 0.5\%$. Le soluzioni sono state iniettate nel sistema HPLC immediatamente dopo la preparazione e, durante l'analisi, non sono stati osservati prodotti di degradazione.

Validazione del metodo

Tutte le procedure di validazione del metodo sono state condotte su una colonna a fase inversa Synergi 4 μ Fusion-RP80Å .

Per la costruzione delle rette di calibrazione, sono state utilizzate cinque soluzioni standard a concentrazioni comprese tra 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ e 0.5 $\mu\text{g/mL}$, a seconda dell'analita; per ogni livello di concentrazione le analisi sono state condotte in triplicato. I coefficienti di correlazione ottenuti sono stati compresi in un range tra 0.9967 e 0.9997. Il limite di rilevabilità (LOD) della tecnica analitica è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere determinata con una certezza statistica nel campione, ed è equivalente a 3 volte la deviazione standard del rumore di fondo registrato durante l'analisi; il limite di quantificazione (LOQ) è calcolato come la concentrazione dell'analita che garantisce un segnale pari a 10 volte la deviazione standard del rumore di fondo durante l'analisi.

Con il detector a fluorescenza (FD), i valori di LOD per BPA, BPB, BPF BADGE e BFDGE, sono risultati compresi tra 0.0042 e 0.0061 $\mu\text{g/g}$, mentre i valori di LOQ tra 0.0237 e 0.0232 $\mu\text{g/g}$ (Tabella 1).

Bisphenol	Slope (a)	Intercept (b)	r	n	Limit of detection (LOD) µg/g	Limit of quantification (LOQ) µg/g
BPF	45179	66.746	0.9997	5	0.0042	0.0172
BPA	40005	68.261	0.9989	5	0.0079	0.0237
BPB	39653	100.83	0.9981	5	0.0136	0.0226
BFDGE	34626	394.68	0.9967	5	0.0102	0.0198
BADGE	43449	237.35	0.9988	5	0.0061	0.0232

Tabella 1. Riassunto dei parametri di calibrazione

La robustezza del metodo analitico è stata valutata su tre differenti colonne a fase inversa utilizzando diverse condizioni di eluizione HPLC: i) Synergi 4 µ Fusion-RP80Å 250 x 4.60 mm i.d., acqua/acetonitrile 40:60 (v/v), ii) Onyx monolithic C₁₈ 100 × 4.6 mm i.d. (Phenomenex, Torrance, CA) acqua/acetonitrile 65:35 (v/v), iii) Sphereclone 5 µ ODS 2 250 × 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA) acqua/acetonitrile 50:50 (v/v). La risoluzione dei picchi è rimasta simile nonostante le differenti condizioni cromatografiche.

La precisione è un importante parametro per valutare il metodo analitico e la performance del sistema cromatografico (Lanças 2004; Currie 1999; EURACHEM 1998; Monteiro et al. 1998). La precisione del sistema cromatografico è stata valutata attraverso la ripetibilità e la precisione intermedia. La ripetibilità è stata valutata attraverso la precisione intra-day, durante la quale sono state analizzati in triplicato gli estratti dei cinque bisfenoli (25; 125.0; 350 µg/kg) mentre quella intermedia è stata valutata iniettando le stesse concentrazioni per dieci giorni differenti.

La RSD % (deviazione relativa standard) è risultata compresa tra 0.018 e 2.99 per le analisi eseguite nei giorni differenti (interday), e tra 0.05 e 2.98 per quelle eseguite nello stesso giorno (intraday). I valori di RSD % sono stati calcolati dividendo la deviazione standard per la media, e moltiplicando tutto per 100 (Tabella 2). I risultati sono stati buoni per i livelli di concentrazione analizzati.

	Repeatability (intra-day precision) n=5			Intermediate precision (inter-day precision) n=10		
Spiked level (µg/kg)	25.0	125.0	350.0	25	125.0	350.0
RSD (%)	0.8-2.5	0.05-1.4	1.5-2.98	0.018-0.19	0.2-2.5	1.2-2.99
Accuracy (%)	96	103	99.6	98	99	100.4

Tabella 2. Precisione ed accuratezza del metodo cromatografico.

L'accuratezza della risposta cromatografica è stata studiata durante le analisi condotte per valutare la precisione inter-day ed è stata espressa come percentuale tra il valore reale della concentrazione iniettata nel sistema HPLC-FD ed il valore ottenuto dall'analisi. La tabella 2 mostra come i risultati reali siano stati compresi tra il 96% ed il 103%, il che indica una ottima accuratezza del sistema cromatografico. La precisione del metodo e l'accuratezza sono inoltre stati valutati attraverso i recuperi ottenuti da campioni arricchiti a diverse concentrazioni.

I recuperi sono stati calcolati come percentuale (%) del rapporto tra la risposta del campione arricchito e la risposta dello standard puro. Ciò indica se il metodo permette di recuperare l'intera quota di analita presente nel campione (Lanças 2004; Monteiro et al. 1998).

Il recupero è calcolato come rapporto tra il segnale dello standard dopo la fase di estrazione ed il segnale dello standard puro, eluito nelle stesse condizioni, espresso come percentuale. Per valutare i recuperi, campioni di controllo, rappresentati da pomodoro in bottiglie di vetro, sono stati addizionati di soluzioni degli standard dei cinque analiti; i campioni sono stati arricchiti a tre diversi livelli di

concentrazione: 25.0 µg/kg, 125.0 µg/kg e 350.0 µg/kg. I campioni di controllo arricchiti sono stati sottoposti alla procedura estrattiva indicata nella sezione *Preparazione del campione ed Estrazione su fase solida (SPE)*. Per ogni livello di arricchimento, l'estrazione è stata condotta in triplicato e per ciascun estratto l'analisi è stata ripetuta tre volte. Ottimi recuperi sono stati ottenuti per tutti gli analiti, compresi tra il 93.5% ed il 104.5% (BPA 104.5% (RSD 2.15%), BPB 103% (RSD 2.03%), BPF 93.5% (RSD 2.68%); BADGE 95% (RSD 3,90) e BFDGE 96.2%(RSD 3.45%); il valore massimo di deviazione relativa standard (RSD) pari al 3.90%, suggerisce una buona accuratezza e precisione del metodo. La selettività e l'efficienza del metodo è mostrata nella Figura 1, dove è riportato un cromatogramma di un estratto di pomodoro arricchito con soluzioni standard dei cinque analiti.

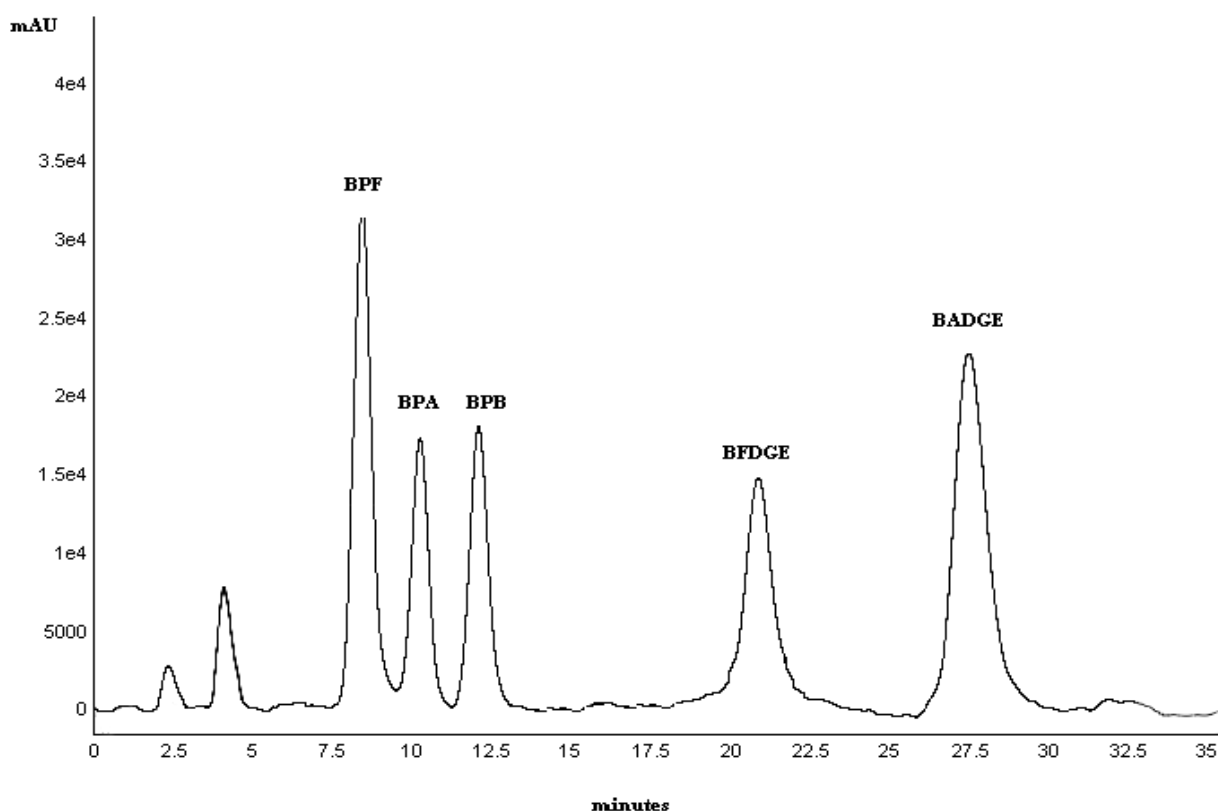


Figura 1. Cromatogramma di un estratto di pomodoro arricchito di BPF, BPA, BPB, BFDGE e BADGE a concentrazione 350 µg/kg

Il cromatogramma mostra chiaramente l'adeguatezza della procedura estrattiva messa a punto.

Conclusioni

La metodica analitica si è mostrata esaustiva nella quantificazione degli analiti in matrice sottoposti alla fase di clean up e di analisi HPLC-FD.

Lo studio dei parametri di validazione mostra come il metodo messo a punto sia preciso ed accurato e garantisca ottimi recuperi dei cinque analiti analizzati.

I valori dei recuperi dei tre livelli di arricchimento sono risultati compresi tra 93.5% e 104.5%, con un valore massimo di deviazione relativa standard (RSD) pari al 3.90%, suggerendo una buona accuratezza e precisione del metodo.

Il metodo può essere quindi efficacemente applicato all'analisi di routine di campioni di pomodoro in scatola che prevedano l'analisi di BPF, BPA, BPB, BFDGE e BADGE.

2.5.4 Validazione di un metodo per la determinazione simultanea di 4-n-nonilfenolo, 4-n-ottilfenolo, 4-tert.-ottilfenolo e 4-n-ottilfenolo monoetossilato tramite HPLC-DAD in campioni di acqua

Lo studio ha avuto lo scopo di sviluppare un metodo analitico per la determinazione e quantificazione di quattro alchilfenoli, 4-n-nonilfenolo, 4-n-ottilfenolo, 4-tert.-ottilfenolo e 4-n-ottilfenolo monoetossilato, in campioni di acqua confezionata in bottiglie di plastica.

Gli analiti sono stati estratti dall'acqua attraverso una fase di clean up effettuata tramite estrazione su fase solida (SPE) e la determinazione quali-quantitativa è stata effettuata tramite HPLC a fase inversa con rivelatore UV diode array.

Le strutture dei quattro alchilfenoli analizzati sono mostrate in Figura 1.

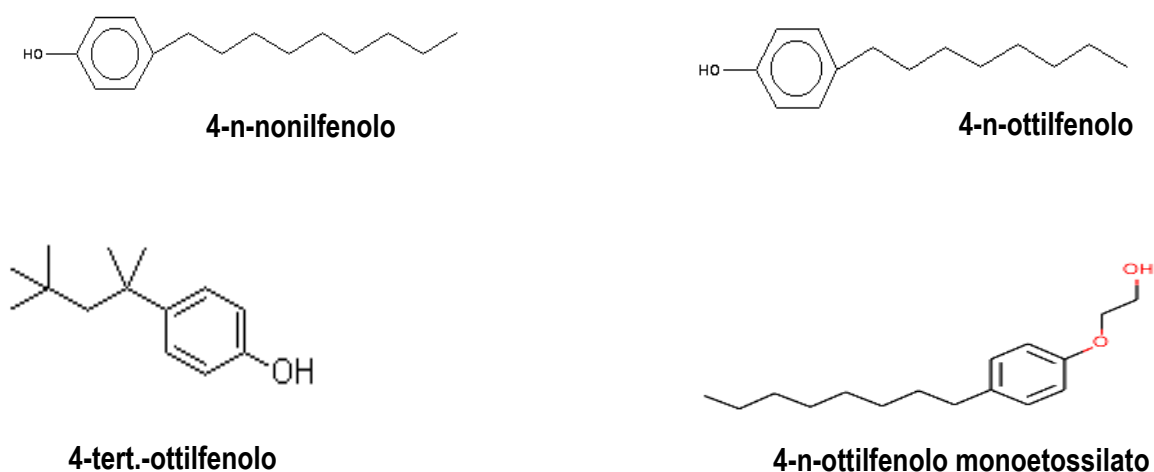


Figura 1. Strutture degli alchilfenoli impiegati nello studio

2.5.4.1 Parte Sperimentale

Preparazione delle soluzioni di standard

Per ciascuno dei quattro analiti è stata preparata una soluzione madre (100 mg L^{-1}) in acetonitrile. Dalla soluzione madre di ciascun analita sono state preparate, per diluizione, le soluzioni standard per la costruzione della retta di calibrazione, nell'intervallo di concentrazione $0.025\text{-}1.0 \text{ mg L}^{-1}$. Le soluzioni madre e standard sono state conservate a 4°C e diluite all'occorrenza.

Preparazione del campione

I campioni di acqua sono stati concentrati con il metodo di estrazione su fase solida utilizzando colonnine LiChrolut EN (200 mg) (Merck, Darmstadt, Germany).

Le colonnine sono state attivate con 3 mL di metanolo e condizionate con 3 mL di acqua Milli-Q. Il campione rappresentato da 1 L di acqua è stato caricato su colonnina utilizzando un flusso costante di 10 mL min^{-1} . Dopo la fase di carico del campione, la colonnina è stata sottoposta ad una fase di lavaggio con 10 mL di acqua deionizzata, sempre ad una velocità di flusso di 10 mL min^{-1} . La colonnina è stata asciugata sottovuoto per 20 minuti e, successivamente, gli analiti sono stati recuperati con 3 mL di una soluzione etilacetato/metanolo 50:50 (v/v). Dal campione così ottenuto il solvente è stato allontanato utilizzando un flusso di N_2 ed il residuo è stato ripreso con 0.5 mL di una soluzione 90:10 (v/v) Acetonitrile/ Acido acetico 0.01% (v/v). Il campione è stato successivamente sottoposto all'analisi HPLC-DAD.

Analisi HPLC-DAD

L'analisi cromatografica (HPLC) di 4-n-nonilfenolo, 4-n-ottilfenolo, 4-tert.ottilfenolo e 4-n-ottilfenolo monoetossilato è stata eseguita con strumentazione Thermo Finnigan® (P4000): degasatore in linea a quattro vie, pompa quaternaria a doppio

pistone reciprocante, iniettore Rheodyne modello 7125, rivelatore a fotodiodi Finnigan Spectra System UV 6000 LP.

I cromatogrammi sono stati acquisiti utilizzando il software gestionale Chromquest 4.2.34.

La separazione degli analiti è stata effettuata utilizzando una colonna C18 ODS Hypersil (250 mm x 4.6 mm i.d., grandezza delle particelle 5 μm) (Thermo, California).

Per l'analisi HPLC dei quattro alchilfenoli è stata utilizzata una metodica isocratica che utilizza una miscela binaria di solventi, con velocità del flusso regolata a 1.00 mL/min. La fase mobile è stata rappresentata da una miscela acetonitrile/acido acetico 0.01% (v/v) in rapporto 90:10 (v/v).

Il detector è stato settato su due lunghezze d'onda, 224 nm e 278 nm che rappresentano i due massimi di assorbimento dei composti analizzati. Gli spettri UV sono stati registrati in un range tra 200-350 nm. La lunghezza d'onda a 278 nm è stata utilizzata per l'analisi quantitativa.

Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente ($\approx 22^\circ\text{C}$) senza l'ausilio di particolari strumenti di termostatazione.

Per l'analisi quantitativa è stato usato il metodo di calibrazione dello standard esterno che ci ha permesso di costruire una retta di calibrazione per ciascuno dei quattro analiti usando standard a differente concentrazione. Gli alchilfenoli sono stati identificati nel campione per comparazione dei tempi di ritenzione e degli spettri di assorbimento UV con quelli degli standards puri eluiti nelle stesse condizioni. Per gli analiti in esame sono state preparate cinque concentrazioni nel range 0.025 e 1.0 mg L⁻¹ (0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg L⁻¹). Dopo ogni iniezione nel sistema HPLC, la curva di calibrazione per i quattro composti è stata costruita correlando l'area del picco cromatografico con la sua concentrazione. Le analisi

sono state condotte in triplicato ed il risultato è stato espresso come media delle tre iniezioni.

Per tutti gli analiti analizzati si è registrato un alto coefficiente di determinazione, nell'intervallo di concentrazione considerato, compresi tra 0.9995 e 0.9999, a seconda dell'analita, Tabella 1.

	Slope (a)	Intercept (b)	r²	n
4-tert-OP	227670	-88.437	0.9995	5
4-n-OP EtO1	170049	-14.056	0.9997	5
4-n-OP	242675	1141.4	0.9998	5
4-n-NP	275298	194.96	0.9999	5

Tabella 1. Parametri di calibrazione di 4-tert-OP, 4-n-OP EtO1, 4-n-OP e 4-n-NP

Resultati e discussione

Condizioni HPLC–DAD

Il sistema HPLC-DAD è stato utilizzato per l'analisi quantitativa di 4-n-NP, 4-n-OP, 4-tert-OP e del 4-n- OP EtO₁. Allo scopo di selezionare quale fosse la migliore fase mobile, sono stati utilizzati differenti solventi, acetonitrile o metanolo, da soli o in combinazione, in diverse percentuali, con acqua o con soluzioni di acido acetico. E' stato notato che la risposta cromatografica degli analiti è molto influenzata dalla composizione della fase eluente usata nell'analisi HPLC; in particolare, una certa percentuale di acqua è necessaria per ottenere una buona separazione, ma è importante stabilizzare la forma non dissociata degli analiti acidificando la fase acquosa (pH=4.02). La separazione ottimale dei quattro analiti si è ottenuta con l'utilizzo di una miscela binaria costituita per il 90% da acetonitrile e per il 10% da una soluzione acquosa di acido acetico 0.01% (v/v) (pH 4.02),

Lo stesso studio è stato fatto per quanto riguarda la fase stazionaria. Sono state testate diverse colonne a fase inversa (ODS Hypersil 5 μ , Luna C8 5 μ , Synergi Max-RP 4 μ , Nucleodur C8 100-5 μ) e soltanto la ODS Hypersil 5 μ è risultata in grado di separare i quattro analiti in tempi brevi. In queste condizioni, il tempo di ritenzione per ciascun alchilfenolo analizzato è risultato costante con una deviazione standard compresa tra 0.5 e 1.4 %, e costante è stata sia la selettività che la risoluzione, come mostrato in Figura 2.

SPE

L'estrazione su fase solida è una valida alternativa all'estrazione liquido-liquido, se si vuole una preparazione rapida ed efficace del campione. Al fine di abbassare i LOQ del metodo, procedure di estrazione e pre-concentrazione devono essere necessarie.

Nell'analisi dei campioni reali, il volume del campione è uno dei più importanti parametri che influenzano il fattore di pre-concentrazione (Seccia et al. 2005). Le colonnine SPE LiChrolut-EN sono capaci di caricare fino ad un 1 L di acqua senza perdita di analita, che a volte si verifica, nonostante la piccola quota di fase sorbente. LiChrolut-EN sono impaccate con un copolimero etilvinilbenzene-divinilbenzene altamente legato, un eccezionale sorbente con una superficie specifica di, approssimativamente, 1200 m²/g che mostra caratteristiche idrofile senza nessuna modificazione della superficie. A causa della sua struttura in micropori (particelle di 10–120 μ m), mostra una alta capacità assorbente, circa 10 volte superiore ad una fase C18 (Junker-Buchheit et al. 1996).

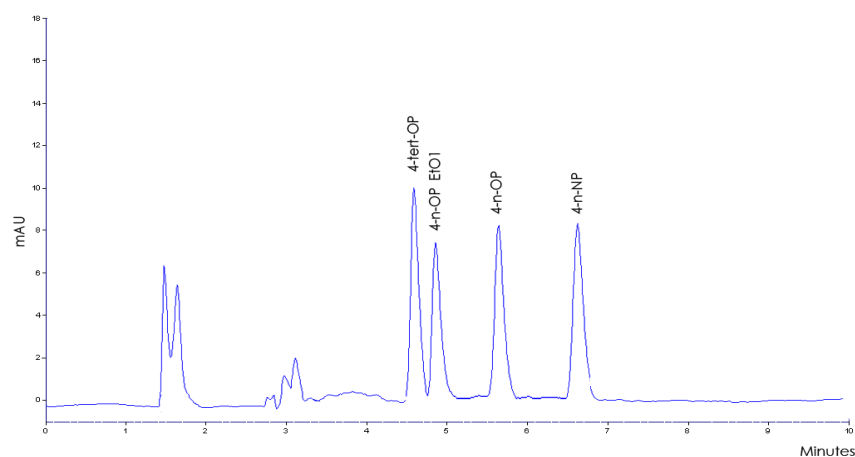


Figura 2. Cromatogramma di un campione di acqua arricchito di una soluzione degli analiti (livello di arricchimento, $0.25\mu\text{g L}^{-1}$): 4-tert.-ottilfenolo, RT = 4.58 min; 4-n-Ottilfenolo monoetossilato, RT = 5.33 min; 4-n-ottilfenolo, RT = 5.66 min; 4-n.nonilfenolo, RT = 6.57 min;

Recuperi

Al fine di validare il metodo, i recuperi sono valutati calcolati su campioni di controllo di acqua, previamente testata per verificare l'assenza degli analiti di interesse ed assunta come bianco, per aggiunta di 0.1 mL delle soluzioni di lavoro multicomponente al fine di ottenere concentrazioni finali di 0.03, 0.1, 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

I campioni di acqua fortificata sono stati concentrati di 2000 volte attraverso il metodo SPE riportato nella sezione *Preparazione del campione* per raggiungere la concentrazione teorica di 0.06, 0.2 and 1.0 mg L^{-1} . Infine, gli estratti sono stati analizzati secondo la metodica HPLC riportata nella sezione *Analisi HPLC*. Ogni test di recupero è stato ripetuto 5 volte e buoni risultati si sono ottenuti per i quattro analiti, con recuperi in un range compreso il 96.1% ed il 103% (Tabella 2).

Drinking water samples (1.0 L)	4-tert-OP (mg L ⁻¹)	R%	4-n-OP-EtO1 (mg L ⁻¹)	R%	4-n-OP (mg L ⁻¹)	R%	4-n-NP (mg L ⁻¹)	R%
0.06 mg L ^{-1a}	0.059	100.8	0.062	96.1	0.063	103.3	0.059	101.1
	0.064		0.055		0.064		0.058	
	0.062		0.056		0.059		0.065	
0.2 mg L ^{-1a}	0.16	95	0.20	98.3	0.19	96.7		101.7
	0.22		0.18		0.19			
	0.19		0.21		0.20			
1.0 mg L ^{-1a}	1.05	101	0.81	95.0	0.95	102		102.6
	0.99		0.93		0.96			
	1.0		0.99		1.15			

^a Drinking water samples after 2000-fold concentration

Tabella 2. Recuperi (R%) ottenuti dai campioni di acqua di 1L di ciascun alchilfenolo addizionato in concentrazione di 0.03, 0.1 and 0.5 µg L⁻¹ (n=5)

Precisione

La precisione del metodo è stata validata attraverso parametri quali ripetibilità e precisione intermedia, espressi attraverso RSD (%)

La ripetibilità (precisione intra-day), valutata analizzando l'estratto preparato nello stesso giorno per ogni livello di arricchimento studiato ed utilizzato per valutare i recuperi, è risultata sempre inferiore del 2.5%.

La precisione intermedia (precisione inter-day) è stata testata attraverso l'analisi, effettuata in 7 giorni diversi, degli estratti di campioni di acqua arricchiti degli analiti a concentrazioni di 0.03, 0.1, 0.5 µg L⁻¹. I replicati (n=6 per ciascun livello di concentrazione) sono stati analizzati e la RSD è stata calcolata per ciascun alchilfenolo. Il metodo è risultato essere preciso, con RSD < 2.8% per tutti i composti studiati nel range considerato (Tabella 2).

	0.03 µg L ⁻¹	0.1 µg L ⁻¹	0.5 µg L ⁻¹	0.03 µg L ⁻¹	0.1 µg L ⁻¹	0.5 µg L ⁻¹
4-tert-OP						
Media	0.028	0.97	0.48	0.031	0.101	0.51
RSD %	2.1	0.96	1.0	1.9	0.12	1.5
Accuratezza %	93	97	96	103	101	102
4-n-OP EtO1						
Media	0.033	0.105	0.59	0.028	0.105	0.51
RSD %	1.9	1.2	1.3	2.1	1.2	1.8
Accuratezza %	110	105	96	93	105	102
4-n-OP						
Media	0.029	0.94	0.53	0.029	0.94	0.49
RSD %	2.8	0.9	0.09	2.5	1.9	0.19
Accuratezza %	97	94	106	97	94	98
4-n-NP						
Media	0.029	0.98	0.49	0.029	0.98	0.49
RSD %	2.4	0.5	0.2	1.9	1.5	1.2
Accuratezza %	97	98	98	97	98	98

Tabella 5. Precisione del metodo (R.S.D.%) valutata su campioni di 1 L di acqua arricchiti di ogni alchilfenolo

LOD e LOQ

I LOD ed I LOQ del metodo sono stati calcolati dai dati di regressione utilizzando il metodo dei minimi quadrati.

La deviazione standard scelta per i valori di LOD ed I LOQ è la deviazione standard residuale della retta di calibrazione.

I risultati di LOD e LOQ, dopo la pre-concentrazione, per tutti gli alchilfenoli analizzati sono stati 0,01 e 0,03 µg L⁻¹, rispettivamente.

Conclusioni

Un ottimo metodo HPLC-DAD per la determinazione simultanea di basse concentrazione di quattro alchilfenoli (4-tert-OP, 4-n-OP EtO1, 4-n-OP e 4-n-NP) in

campioni di acqua è stato sviluppato. Il metodo è stato validato nel range di concentrazione considerato, compreso tra 0.025 - 1.0 µg L⁻¹.

Per la validazione del metodo sono stati valutati parametri quali linearità, precisione – intraday ed interday -, accuratezza, recuperi, LOD e LOQ. Il metodo è risultato preciso ed accurato ($0.2\% \leq R.S.D. \leq 2.8\%$) ed ha fornito ottimi recuperi (95–104%) per tutte le concentrazioni analizzate. La procedura di pre-concentrazione ha permesso di apprezzare concentrazioni nell'ordine dei µg L⁻¹ e la metodica semplice rende il tutto molto veloce.

Il metodo è stato performato su campioni di acqua Milli-Q ma è destinato all'analisi di campioni di acqua, e di altre bevande analcoliche, contenuta in bottiglie di plastica, al fine di verificare la possibile migrazione di tali composti dalle plastiche all'acqua.

Bibliografia

Agrese E, et al. (1994) Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environ Toxicol Chem* 13(5):737-742

Ahel M, Giger W (1993) Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26(8):1461-70

Ahel M, Giger W, Koch M (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat Res* 28(5):1131-1142

Baldi F, Mantovani A (2008) "A new database for food safety: EDID (Endocrine disrupting chemicals-Diet Interaction Database)" Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy. *ANN IST SUPER SANITA'* Vol.44, No. 1:57-63

Ben-Jonathan N, Steinmetz R (1998) "Xenoestrogens: The Emerging Story of Bisphenol A. Elsevier Science Ltd, 1043-2760/98 PII: S1043-2760(98)00029-0

Bicknell RJ, Herbicon AE, Sumpter JP (1995) Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents. *J Steroid Biochem Molec Biol* 54(1/2):7-9

Biles JE, White KD, McNeal TP, Begley TH (1999). Determination of the diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods. *J Agric Food Chem* 47(5): 1965-1969

Biles, J. E.; McNeal, T. P.; Begley, T. H.; Hollifield, H. C. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate foodcontact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3541–3544

Birnbaum LS, Fenton SE (2003) *Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors* (2003) *Environ Health Perspect* 111: 389-94

Bouskine A, Nebout M, Brücker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P (2009) *Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor*. *Environmental Health Perspectives* Volume 117(7): 1053-1058

Braunrath, R.; Cichna, M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 2005a, 1062, 189–198

Braunrath, R.; Podlipna, D.; Padlesak, S.; Cichna-Markl, M. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 2005b, 53, 8911–8917

Brede, C.; Fjeldal, P.; Skjevrak, I.; Herikstad, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit. Contam.* 2003, 20, 684–689

Brunner PH, Capri S, Marcomini A, Giger W (1988) Occurrence and behaviour of linearalkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Research* 22:1465

Calamandrei G, La Rocca C, Venerosi A Pesciolini, Mantovani A (2009) "Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana".2009, vi, 95 p. Rapporti ISTISAN 09/18

Cao XL, Dufresne G, Belisle S, Clement G, Falicki M, Beraldin F, Rulibikiye A (2008) Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *J Agric Food Chem* 56: 7919-7924

Casajuana N and Lacorte S (2003) Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* 57: 649-655

Casajuana N, Lacorte S (2004) New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglyciyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J. Agric. Food Chem* 52: 3702-3707

Crayton JW, Meltzer HY (1976) Motor endplate alterations in schizophrenic patients. *Nature* 264:658–9

Cserháti T (1995) Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: Interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environ Health Persp* 103 :358-364

Currie LA (1999) Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal Chim Acta* 391: 105–126.

Davis DL, Bradlow HL (1995) Can environmental estrogens cause breast cancer? *Scientific American* (October):166-172

Dodds EC, Lawson W (1938) Molecular structure in relation to estrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc.Royal Soc.Lon.B* 125:222-232

EC (European Commission) (2011) Regulation No 10/2011 of the European Parliament and of the council of 14 January 2011 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing

EC (European Commission) (2005) Official Journal of the European Union. No. L 302/28, Commission Regulation No. 1895/2005

EFSA (2006) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). *EFSA J.* 428, 1-75.

EFSA (2010) Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). Panel members: Arturo Anadón, Mona-Lise Binderup, Wilfried Bursch, Laurence Castle, Riccardo Crebelli, Karl-Heinz Engel, Roland Franz, Nathalie Gontard, Thomas Haertlé, Trin Husøy, Klaus-Dieter Jany, Catherine Leclercq, Jean-Claude Lhuguenot, Wim Mennes, Maria Rosaria Milana, Karla Pfaff, Kjetil Svensson, Fidel Toldrá, Rosemary Waring, Detlef Wölflé. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2010; 8(9):1829

Elsby R, Maggs JL, Ashby J, Park BK (2001) Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: Implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 103–113

Eurachem Guide (1998) The fitness for purpose of analytical methods, Teddington, UK. Available: <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf/> Accessed 04 Nov 2011

Fatima Pocas M, Hogg T (2007) Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review. *Food Sci Technol* 18:219–30

Fernandes AR, Rose M, Charlton C (2008) 4-Nonylphenol (NP) in food contact materials: analytical methodology and occurrence. *Food Addit Contam* 25: 364-72

Ferrara F, Fabietti F, Delise M, Bocca AP, Funari F (2001) Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environmental Science & Technology* 35(15):3109-12

Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G (2004) Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 18(3):413–21

Fox D “Powder Coating to Recycling (Rubber)” in “Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology” 3 rd edition, M. Grayson ed.; Vol 18 Wiley-Interscience, New York 1982, 479-494

Freitag D, Grigo U, Muller PR, Nouvertnè W (1988) “Encyclopedia of Polymer Science and engineering”, Wiley-Interscience Publisher, New York, vol 11: 650

Gioiosa L, Fissore E, Parmigiani S, Palanza P (2007) Developmental exposure to low doses of environmental estrogens alters sex differences in exploration and emotional behavior in mice. *Horm Behav* 52:307-16

Grumetto L, Montesano D, Seccia S., Albrizio S, Barbato F. Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 10633–10637

Grumetto L, Montesano D, Seccia S., Albrizio S, Barbato F. Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 10633–10637

GU (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea) (2011) Direttiva 2011/8/UE della commissione del 28 gennaio 2011 che modifica la direttiva 2002/72/CE per quanto riguarda le restrizioni d'impiego del bisfenolo A nei biberon di plastica

Guart A, Bono-Blay F, Borrell A, Lacorte S (2011) Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28(5): 676-685

Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prasta H, Raecker T (2002) Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* 36:1676-80

Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS (2006) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulate .phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 66: 5624–32

Hunt P, et al (2003) Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology* 13(7): 546-553

Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* **103**: 582-587

Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(2):194-202

Jobling S, Sumpter JP (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27:361-72

Junker-Buchheit A, Witzenbacher M (1996) *J Chromatogr A* 737:67

Katzung BG (2003) *Farmacologia Generale e Clinica*, V edizione (Ed. Piccin)

Kavlock RJ, Daston GP, De Rosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kattari S et al. Research need for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors : a report of U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996;104(suppl 4):715-40

Kitamura S, Sanoh S, Kohta R, Suzuki T, Sugihara K, Fujimoto N, Ohta S (2003). Metabolic activation of proestrogenic diphenyl and related compounds by rat liver microsomes. *J. Health Sci.* 49, 298–310

Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S (2005) Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 84:249–259

Lanças FM (2004) *Validação de Metodos Cromatograficos de Análise*. Rima, Sao Carlos, 62p

- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K (2003) Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 75(1):40–6
- MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C (2005) The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect* 113(6):675–9
- Maragou NC, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA (2006) Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 129: 165-173
- Marcomini A, et al. (1990) Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Marine Chem* 29:307-323
- Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, Olea-Serrano F (2009) Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol* 47: 506-510
- McNeal TP, Biles JE, Begley TH, Craun JC, Hopper ML, Sack CA (200) Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. In: McNeal TP, Biles JE, Begley TH, Craun JC, Hopper ML, Sack CA, editors. *Analysis of environmental endocrine disruptors*, 747. Washington, DC: American Chemical Society, p.33-52
- Menditto A, Caroli S, di Domenico A, Mantovani A, Silvestroni L, Spagnolo A, Traina ME, Alleva E (1997) “Gli “endocrine disruptors”: un problema emergente nel campo della sicurezza dei composti chimici”. *Notiz. Ist. Sup. Sanità* 10:1-7
- Michelangeli F, et al. (1990) Mechanism of inhibition of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase by nonylphenol. *Biochem* 29:3091-3101
- Monteiro M, Nerin C, Rubio C, Reyes FGR (1998) A GC/MS method for determining UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. *High Resolution Chromatogr* 21: 317–320
- Moriyama K et al (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology Metabol* 87: 5185-5190
- Mortensen GK, Main KM, Andersson AM, Leffers H, Skakkebaek NE (2005) Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem* (382) 1084-1092
- Mueller G, Kim UH (1978) Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. *Endocrinol* 102:1429-1435
- Muncke J (2009) Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Science of Total Environment* 407: 4549-4559
- Munguía-Lopez, E. M., Soto-Valdez, H., 2001. Effect of heat processing and storage time on migration of Bisphenol A and bisphenol A-diglycidyl ether to aqueous food stimulant from Mexican can coating. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3666-3671

Munguía-Lopez, E. M., Soto-Valdez, H., 2001. Effect of heat processing and storage time on migration of Bisphenol A and bisphenol A-diglycidyl ether to aqueous food stimulant from Mexican can coating. *J Agric Food Chem* 49:3666-3671

Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23:383–90

National Research Council of Canada (1982) Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. Subcommittee on Pesticides and Industrial Organic Chemicals. Aminocarb: The effects of its use on the forest and the human environment. Ottawa, Canada.

Naylor CG (1995) Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Textile Chemist and Colorist* 27:29-33

Nerin, C.; Fernandez, C.; Domeno, C.; Salafranca, J. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5647–5653.

Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E (2009) Prenatal Exposure to Bisphenol A at Environmentally-Relevant Doses Adversely Affects the Murine Female Reproductive Tract Later in Life. *Environ Health Perspect* 116:879–85

Nimrod AC, Benson WH (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology* 26(3):335-64

Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S (2008) Effects of developmental exposure to bisphenol-A on brain and behavior in mice *Env Res* 2(108): 150-7

Pardo O, Yusà V, León N, Pastor A (2006) Determination of bisphenol diglycidyl ether residues in canned foods by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1107: 70-78

Purdum CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8:275-85

Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002) Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives* 110: 917-921

Raecker T, Thiele B, Boehme RM, Guenther K (2011) Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* 82: 1533-1540

Rano L (2008) EFSA to review BPA advice on the back of US, Canadian concerns. www.foodproductiondaily.com.

- Rier SE, et al. (1993) Endometriosis in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fund Appl Toxicol* 21:433-441
- Seccia S, Fidente P, Barbini DA, Morrica P (2005) Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry *Analytica Chimica Acta* 553 (553) 21–26
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–91
- Sharpe RM (1995) Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Persp* 103(12):1136-1143
- Soto AM, et al. (1991) p-Nonyl phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ Health Persp* 92:167-173
- Soto AM, et al. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Persp* 103(7): 113-122.
- Sun, C.; Leong, L. P.; Barlow, P. J.; Chan, S. H.; Bloodworth, B. C. Single laboratory validation of a method for the determination of Bisphenol A, Bisphenol A diglycidyl ether and its derivatives in canned foods by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2006, 1129, 145–148.
- Takahashi O, Oishi S (2000) Disposition of Orally Administered BPA in Pregnant Rats and the Placental Transfer to Fetuses. *Environmental Health Perspectives* 108:931-935
- Toyo’oka T, Oshige Y (2000) Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. *Anal Sci* 16:1071-6
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Brine DR, Fail PA, Seely JC, Van Miller JP (1999) Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30:81-95
- U.S. EPA (1995) Office of Pesticide Programs. Unpublished lists provided under the Freedom of Information Act. (June 23 and July 17.)
- U.S. EPA. (1993) Pesticides and Toxic Substances. Pesticide reregistration rejection rate analysis: Toxicology. Washington, D.C. (July.)
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) “Human exposure to bisphenol A (BPA)”. *Reproductive Toxicology* 24:139–177
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2009) “Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption” *Endocrine Reviews* 30(1):75–95
- Vial J, Jardy A (1999) *Anal. Chem.* (71) 2672
- Vom Saal FS, Welshons WV (2006) Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research* 100: 50-76

Vos J, Dbing E, Greim HA, Ladefoge O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak D (2000) Health effects of the endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30(1):71-133

Wetherill YB, Benson T. Akingbemi, Jun Kanno, John A. McLachlan, Angel Nadal, Carlos Sonnenschein, Cheryl S. Watson, R. Thomas Zoeller, Scott M. Belcher (2007) In vitro molecular mechanism of bisphenol A action *Reproductive Toxicology* 24: 178-198

White R, et al. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.* 135(1):175-182.

Con l'aumento della popolarità per il cibo conveniente, il polistirene è diventato il polimero più popolare per i contenitori take-away (Sanagi et al. 2008). In molti paesi, specialmente in Brasile, l'uso di bicchieri monouso in polistirene è molto esteso, sottoponendo i consumatori ad un'intensa e continua esposizione.

L'esposizione cronica alla stirene, determina sonnolenza, perdita di memoria, mal di testa e vertigini (Sanagi et al. 2008; Silva et al. 2000). Il monomero può avere effetti depressivi sul sistema nervoso centrale, causando scompensi neurologici. Studi epidemiologici mostrano come l'esposizione allo stirene in concentrazioni uguali o superiori a 50 ppm (210 mg/m³) sia associata a deficit neurofisiologici, come diminuzione del tempo di reazione e disfunzioni vestibolo motorie (WHO 2000; Cheery et al. 1990). Effetti genotossici sulle cellule del sangue sono stati osservati in lavoratori dell'industria plastica esposti a concentrazioni comprese tra 20–30 ppm (85 – 128 mg/m³) ed oltre. Danni al DNA sono stati osservati a livelli di esposizione superiori a 10 ppm (ATSDR 2007; Cheery et al. 1990).

L'Agenzia Internazionale per la ricerca sul cancro (IARC, International Agency for Research on Cancer) dell'Organizzazione Mondiale della Salute (WHO, World Health Organization) ha classificato lo stirene nel gruppo dei carcinogeni 2B, i quali possono essere possibilmente carcinogeni per l'uomo (IARC 2002). L'Agenzia statunitense per la Protezione Ambientale (U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency) ha definito lo stirene come sostanza sospetta di essere cancerogena e come tossina per il tratto gastrointestinale, per i reni e per il sistema respiratorio (ATSDR 2007). Il Programma Tossicologico Nazionale (NTP, National Toxicology Program) del Dipartimento statunitense per la salute ed i servizi umani ha valutato la potenziale tossicità dello stirene. Lo stirene è stato definito sostanza ragionevolmente cancerogena. Ci sono limitati studi sull'attività carcinogenica dello stirene sugli uomini, sufficienti evidenze della carcinogenicità sugli animali e dati di supporto sul meccanismo carcinogenico (NTP 2011).

La capacità dello stirene di indurre cancro è stata testata in topi e ratti attraverso somministrazione orale, ed in ratti attraverso inalazione. Gli studi sugli animali hanno prodotto risultati variabili e limitate evidenze sulla capacità carcinogenica (IARC 2002; WHO 2000; Cheery et al. 1990). Dall'altra parte, lo stirene -7,8-ossido è un metabolite reattivo dello stirene che ha mostrato risultati carcinogenici positivi in saggi di esposizione orale. Ci sono sufficienti evidenze su animali da laboratorio della carcinogenicità dello stirene-7,8-ossido, nonostante l'inadeguata evidenza negli organismi umani. L'ossido di stirene è stato determinato in lavoratori esposti allo stirene (IARC 1994). IARC ha infatti classificato lo stirene-7,8-ossido nel gruppo 2A dei cancerogeni, come probabile carcinogeno per la salute umana (IARC 1994).

L'esposizione lavorativa è considerata la principale fonte di contaminazione da stirene. Numerosi studi epidemiologici condotti su lavoratori dell'industria plastica hanno mostrato un aumento del rischio di tumori linfatici ed ematopoietici all'aumento del tempo di esposizione; nonostante questo non si è osservato aumento del rischio con l'aumento della quantità di stirene a cui si è esposti (ATSDR 2007; Papaleo et al. 2004; IARC 2002; Kolstad et al. 1999a; Kolstad et al. 1999b).

Numerosi dati disponibili (Tang *et al.*, 2000) in letteratura mostrano come l'esposizione giornaliera allo stirene della popolazione generale oscilli in un range di 18.2–55.2 µg per persona (0.3–0.8 µg/kg of body weight) o, annualmente, in un range di 6.7–20.2 mg per persona (95.7–288 µg/kg body weight), principalmente a causa dell'inalazione e dall'assunzione attraverso la dieta. La quantità di stirene inalata contribuisce per più del 90% alla quota totale.

Lo stirene negli alimenti è presente principalmente per un problema di migrazione dal polimero del materiale a contatto con l'alimento. Alcuni autori riportano come anche il fumo di sigaretta sia un'importante fonte di contaminazione: la quota

assunta, fumando 20 sigarette, è stimata essere superiore rispetto alla quantità presente in cibo ed aria.

Lo stirene è stato determinato nell'atmosfera in molte località. La presenza nell'aria è dovuta principalmente alle emissioni provenienti dalle industrie che producono polimeri e co-polimeri nella cui produzione rientra tale monomero. Altre fonti di stirene nell'ambiente includono gli scarichi delle macchine, il fumo di sigarette ed altre forme di combustione e di incenerimento dei polimeri dello stirene (WHO 1983).

Nonostante lo stirene sia stato solo occasionalmente determinato negli estuari, nelle falde acquifere e nell'acqua potabile, la sua presenza è da correlare alla presenza nelle vicinanze di industrie o all'uso di dispositivi impropri (WHO, 1983; Law et al. 1991). In studi condotti in Canada sulle forniture di acqua potabile, la frequenza di determinazione dello stirene è stata bassa; quando determinato, il livello era generalmente al di sotto di 1 µg/L (Newhook and Caldwell 1993). Dopo lo scandalo, in Spagna, dell'acqua potabile contaminata con stirene, sono stati riscontrati livelli transitori al di sopra dei 900 µg/L (Arnedo-Pena *et al.* 2002).

Il polistirene e i suoi copolimeri sono largamente utilizzati nel food packaging e residui monomerici di stirene possono migrare dal contenitore all'alimento (WHO, 1983).

L'analisi di 133 contenitori di plastica per alimenti nel Regno Unito hanno mostrato concentrazioni residuali tra 16 e 1300 mg/kg; il 73% dei contenitori analizzati ha mostrato concentrazioni di stirene tra 100–500 mg/kg, e solo cinque hanno mostrato livelli superiori a 1000 mg/kg. Il cibo nei contenitori ha mostrato livelli di monomero migrato in un range tra 1 e 200 µg/kg, tuttavia il 77% del cibo mostrava livelli inferiori a 10 µg/kg ed il 26% mostrava livelli inferiori a 1 µg/kg (Gilbert & Startin, 1983). Simili studi sono stati effettuati dal Food Safety Directorate tra il 1992 ed il 1994 nel Regno Unito, con risultati simili allo studio condotto nel 1983. In ciascuno di ogni tipo di alimento, alti livelli di stirene sono stati osservati per i

prodotti ad alto contenuto di grasso o impacchettati in piccoli contenitori (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994).

Tra il 1991 ed il 1999, la Total Diet Study della Food and Drug Administration, negli USA, ha analizzato 320 diversi alimenti e ritrovato livelli di stirene monomero in 49 di questi. In 258 campioni risultati positivi, la concentrazione per ciascun alimento variava tra 10 µg/kg (uova) e 274 µg/kg (fragole). La concentrazione media per i 49 alimenti era di 21 µg/kg (Food and Drug Administration, 2000).

Nel 1981, la Food and Drug Administration, negli USA, ha misurato la migrazione del monomero per un periodo di 24 ore, da diversi polimeri in stirene, in etanolo all'8% e da acqua a 49 °C.

Numerosi studi hanno mostrato che lo stirene ed altri composti volatili presenti nel food packaging hanno la potenzialità di migrare nel cibo con cui entrano in contatto (Paraskevopoulou et al. 2011; Chiesa et al. 2010; Tang et al 2000; Tawfik et al 1998; Vandenburg et al. 1997; Lickly et al. 1995; Lickly et al. 1997; Murphy et al. 1992).

Numerose osservazioni sono state fatte circa la stima della quantità di stirene assunta con la dieta (EDI, estimated daily intake) a causa della contaminazione da imballaggio.

In uno studio del 1983, la EDI per il monomero di stirene oscillava in un range tra 1 e 4 µg al giorno (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1989). Più recentemente, Lickly et al. (1995) hanno stimato la quota di stirene assunta con la dieta intorno a 9 µg al giorno.

Lo stirene è stato determinato a basse concentrazioni in numerosi alimenti e bevande le quali non erano mai entrate in contatto con materiali in polistirene (Maarse, 1992a,b; Steele, 1992, Steele *et al.*, 1994). Alti livelli furono riscontrati nella cannella (around 40 mg/kg) ed in questo caso fu ipotizzata come possibile fonte i derivati della degradazione enzimatica dell'acido cinnammico (Oliviero,

1906; Ducruet, 1984). Le basse concentrazioni di stirene negli altri alimenti suggerivano un'attività enzimatica e/o microbica, ma non è chiaro quanto questo possa influire sui livelli determinati (Steele *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2000).

Per i lavoratori nell'industria plastica, è stata stabilita dal WHO (1993) una dose tollerabile giornaliera (TDI, tolerable daily intake) di 7.7 µg/kg di peso corporeo per lo stirene, con un valore di riferimento per l'acqua potabile di 20 µg/L. L'Agenzia per la Protezione Ambientale (US EPA 2001b) ha fissato, negli USA, un massimo limite di contaminazione da stirene per l'acqua potabile di 0.1 mg/L. La Food and Drug Administration (2001) ha emanato, negli USA, una regolamentazione circa l'uso di polimeri e copolimeri di stirene nei materiali destinati a venire in contatto con gli alimenti; il contenuto residuale nei polimeri destinati al contatto con alimenti grassi non deve essere superiore allo 0.5%.

Il fatto che lo stirene può produrre diversi effetti nocivi provoca un certo allarme per la salute pubblica, considerando che quantità tra 3 e 7 ng/kg di peso corporeo (Verzera *et al.* 2010) sono assunte involontariamente attraverso la dieta.

3.2 Parte Sperimentale

Il presente lavoro è stato svolto durante un “sandwich program” della durata di sei mesi (Settembre 2010-Febbraio 2011), nell’ambito del progetto EMUNDUS 15, presso il Dipartimento di Alimenti e Nutrizione della Facoltà di Scienze Farmaceutiche dell’Universidade ESTADUAL PAULISTA “Júlio De Mesquita Filho” - Campus di Araraquara. Il mio lavoro, condotto sotto la supervisione della Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva, ha previsto la messa a punto e la validazione di un metodo GC-FID per la determinazione di monomeri residuali di stirene in bicchieri monouso per acqua e caffè, tra le più comuni e diffuse marche produttrici in Brasile e, successivamente, ne è stata valutata la possibile migrazione in simulanti alimentari. I materiali di cui erano fatti i bicchieri erano rappresentati da: polistirene espanso (EPS), polistirene omopolimero e polistirene copolimero.

La migrazione è stata valutata in diversi simulanti alimentari, acqua ed etanolo al 20%, ed a diverse condizioni di temperature; nei casi citati i livelli di stirene migrato sono risultati al di sotto del LOD.

Preparazione delle Soluzioni

Le soluzioni stock dello stirene standard (850.94 µg/mL) e dello standard interno dell’ossido di stirene (270.83 µg/mL) sono state entrambe preparate in metanolo e conservate a 0°C per non più di tre mesi, e diluite al bisogno con metanolo per ottenere le soluzioni da utilizzare nella costruzione della curva di calibrazione e nella validazione del metodo.

Condizioni strumentali e cromatografiche

Per l’analisi quali quantitativa è stato usato un gas cromatografo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) munito di un detector a ionizzazione di

fiamma (FID). I cromatogrammi sono stati acquisiti ed analizzati utilizzando il software Shimadzu GC solution acquisition program.

La separazione cromatografica è stata performata su una colonna capillare DB-5 (30 m X 0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness, J & W). Il forno è stato settato in modo da mantenere la temperatura della colonna a 40°C per 2 minuti ed aumentare poi, di 1°C/min, alla temperatura di 55°C. La temperatura della colonna è stata incrementata alla velocità di 10°C/min fino 280°C, dove si è mantenuta per 5 minuti. Il carrier gas è stato l'idrogeno al flusso di 40,0 mL/min e l'azoto è stato il make-up gas. Le iniezioni (2 μ l) sono state effettuate a 280°C in split mode (1:10). La temperatura del detector è stata di 280°C.

Estrazione del monomero residuale di stirene dal polimero

L'estrazione ha previsto che un campione (3.0 g) di ciascun esemplare di bicchiere in polistirene fosse tagliato manualmente in pezzi (1cm²) ed addizionato di diclorometano; il tutto è stato sonicato con bagnetto ad ultrasuoni per 10 min e successivamente è stato aggiunto del metanolo per favorire la precipitazione del polimero. La soluzione è stata filtrata attraverso filtro di carta Whatman n° 1 al fine di allontanare il residuo. Gli step di estrazione e precipitazione sono stati ripetuti due volte. Le frazioni ottenute sono state unite ed il volume finale completato con metanolo. Un'aliquota è stata prelevata e filtrata (Millex PTFE 0,22 μ m), posta in un matraccio, addizionata della soluzione dello standard interno e, successivamente, 2 μ l sono stati iniettati nel sistema GC-FID.

Validazione

La validazione del metodo analitico è stata eseguita seguendo i protocolli riportati in letteratura (IUPAC 2006; Lanças 2004; Ribani et al. 2004; Currie 1999; EURACHEM 1998). Sono state valutate la calibrazione e la linearità, il limite di rivelazione (LOD) ed il limite di quantificazione (LOQ), la precisione e l'accuratezza del metodo. Per valutare i recuperi, le soluzioni standard di stirene in metanolo

(11.33; 141.64; 509.82 $\mu\text{g/g}$) sono state poste in contatto con i campioni di bicchiere (3.0 g) per 12 h e successivamente la procedura estrattiva riportata nella sezione *Estrazione del monomero residuale di stirene dal polimero* è stata adottata.

Quantizzazione

Per la quantizzazione, è stata misurata l'area del picco e la procedura dello standard interno è stata usata sia per la costruzione della retta di calibrazione che per l'analisi dei campioni reali. L'uso dello standard interno è consigliato in GC al fine di compensare la variabilità dell'iniezione a causa del piccolo volume di soluzione campione prelevata con la siringa e la possibile evaporazione del solvente o dell'analita dalla soluzione campione (Altria 2002).

La curva di calibrazione è stata costruita usando soluzioni standard di stirene nel range di concentrazione tra 0.22-17.02 $\mu\text{g/mL}$. La concentrazione finale della soluzione di stirene ossido, usato come standard interno, è stata di 2.71 $\mu\text{g/mL}$.

I livelli di stirene residuale ottenuti dai bicchieri analizzati sono stati sottoposti al test ANOVA. Il test di Tukey è stato usato per comparare differenze che mostrano $p \leq 0.05$.

Condizioni del test di migrazione

Per i saggi di migrazione, i bicchieri in polistirene sono stati manualmente tagliati in pezzi con area superficiale di 6 cm^2 (2 x 3 cm^2), con un peso variabile tra 0.0459-0.3317 g ciascuno, e singolarmente posti in contatto con 10 mL del simulante alimentare all'interno di specifiche vial di vetro chiuse ermeticamente. L'acqua ed una soluzione di etanolo al 20% (v/v) sono stati usati come simulanti alimentari (EC 2011). I campioni sono stati posti in contatto con il simulante alimentare a temperatura e tempo che rappresentino le peggiori condizioni d'uso, in accordo con quanto riportato nelle specifiche per saggi di migrazione (EC 2011). Le vial contenenti l'acqua sono state poste in stufa a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 giorni ed a 100°C per 30 minuti, e quelle contenenti la soluzione al 20% di etanolo sono state riscaldate

per 30 minuti a 100°C. Le analisi per ciascun campione sono state condotte in triplicato. Il solo simulante alimentare, sottoposto alle stesse condizioni di riscaldamento, ha rappresentato il bianco. In seguito al contatto, i campioni plastici sono stati rimossi, un'aliquota (4 mL) prelevata e posta in un matraccio, lo standard interno addizionato, e successivamente 2 µL sono stati iniettati nel sistema GC-FID.

Risultati e discussione

Le condizioni cromatografiche usate per separare lo stirene e lo stirene ossido hanno garantito una buona risoluzione. Non è stata osservata la presenza di composti interferenti nella zona di eluizione degli analiti in esame.

In primo luogo, al fine di decidere quale solvente fosse il migliore nell'estrazione dello stirene dai campioni di bicchieri, sono stati testati diversi solventi (metanolo, acetone, diclorometano e N,N'-dimetilacetammide (DMA)). Il metanolo è stato testato per la sua polarità ed anche perché è stato usato nella preparazione delle soluzioni standard; sono stati testati inoltre solventi quali l'acetone (ANVISA 1999) per l'intermedia polarità mentre il diclorometano (Monteiro et al. 1998; Vandenburg et al. 1997) e la DMA (PIRA 2003) perché sono descritti in letteratura per le buone proprietà estrattive di composti ad intermedia polarità da materiali plastici. I campioni sono stati sottoposti alla procedura estrattiva, come quanto descritto, utilizzando tutti i solventi riportati. Differenze nell'area del picco e nella limpidezza della soluzione sono apparsi dipendenti dall'uso del solvente. Tra i solventi estrattori testati, il diclorometano è risultato il migliore e il metanolo è stato usato per precipitare il polimero e completare il volume dell'estratto, dando una soluzione limpida. Le stesse considerazione sono state effettuate sul solvente da utilizzare nella preparazione delle soluzioni stock. Metanolo, diclorometano ed acetone sono stati testati ed il primo è risultato il migliore garantendo una buona risoluzione del picco (Figura 1a).

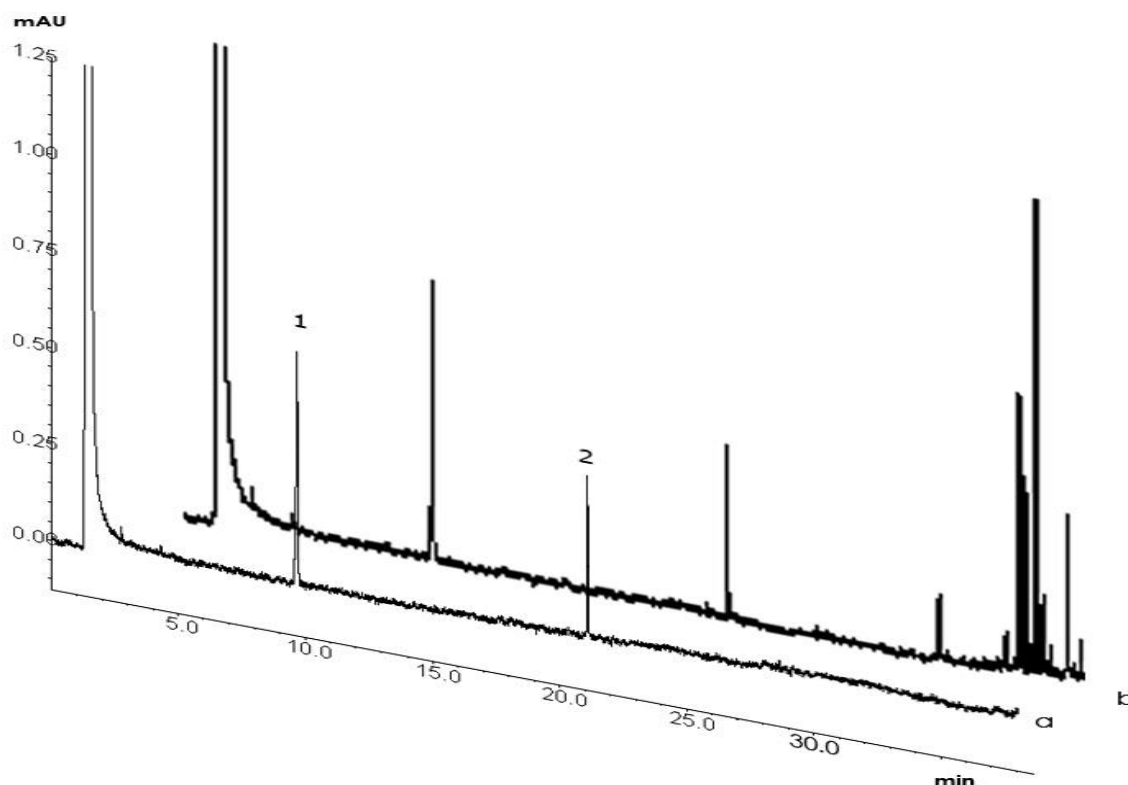


Figura 1. Comparazione tra: (a) un cromatogramma di una soluzione standard a concentrazione 0.85 µg/mL (1. Stirene, t_r: 9.7 min; 2. Stirene ossido, t_r: 21.1 min) ; (b) un cromatogramma di un campione reale (Campione 5). Il campione è stato estratto e sottoposto all'analisi GC-FID nelle stesse condizioni di eluizione degli standard puri.

Validazione

La curva di calibrazione dello stirene è apparsa lineare nel range di concentrazione considerato (0.22–17.02 µg/mL), con un coefficiente di correlazione (r) di 0.99979.

Per ogni punto della curva di calibrazione (0.22, 0.85, 4.25, 8.51, 17.02 µg/ml) l'analisi è stata effettuata in pentuplicato.

La precisione è un importante parametro per valutare il metodo analitico e la performance del sistema cromatografico (Lanças 2004; Currie 1999; EURACHEM 1998; Monteiro et al. 1998). La precisione del sistema cromatografico è stata

valutata attraverso la ripetibilità e la precisione intermedia. La ripetibilità è stata valutata attraverso la precisione intraday, durante la quale sono state analizzate in triplicato tre livelli di concentrazione (0.42; 2.13; 6.81 µg/mL) mentre quella intermedia è stata valutata iniettando le stesse concentrazioni in eptuplicato, in giorni differenti.

I valori di RSD relative alle analisi intraday ed interday sono stati inferiori al 4.2 ed al 5.9%, rispettivamente (Tabella 1). I risultati sono stati buoni per i livelli di concentrazione analizzati.

	Repeatability (intra-day precision) n=3			Intermediate precision (inter-day precision) n=7		
Spiked level (µg/mL)	0.43	2.12	6.81	0.44	2.13	6.90
Found ((µg/mL)	0.45+0.01	2.05+0.08	6.80+0.08	0.48+0.02	2.02+0.08	6.81+0.08
RSD	4.2	4.2	1.2	5.9	4.1	1.2
Accuracy	105.7	96.64	100.36	112.22	95.14	100.08

Tabella 1. Precisione ed accuratezza del metodo cromatografico

L'accuratezza della risposta cromatografica è stata studiata durante le analisi condotte per valutare la precisione interday ed è stata espressa come percentuale tra il valore reale della concentrazione iniettata nel sistema GC-FID ed il valore ottenuto dall'analisi. La tabella 1 mostra come i risultati reali siano stati superiori al 95.14%, il che indica una ottima accuratezza del sistema cromatografico.

La precisione del metodo e l'accuratezza sono stati valutati attraverso i recuperi ottenuti da campioni arricchiti a diverse concentrazioni. I recuperi sono

stati calcolati come percentuale (%) del rapporto tra la risposta del campione arricchito e la risposta dello standard puro. Ciò indica se il metodo permette di recuperare l'intera quota di analita presente nel campione (Lanças 2004; PIRA 2003; Monteiro et al. 1998). Il recupero è calcolato come rapporto tra il segnale dello standard dopo la fase di estrazione ed il segnale dello standard puro, eluito nelle stesse condizioni, espresso come percentuale. Per valutare i recuperi, è stato scelto un unico tipo di bicchiere (Campione 5) ed addizionato di una quantità di stirene standard in maniera tale da ottenere tre differenti livelli di arricchimento. Per ogni livello di arricchimento, l'estrazione è stata condotta in triplicato e per ciascun estratto l'analisi è stata ripetuta tre volte. I valori dei recuperi dei tre livelli di arricchimento sono risultati compresi tra 98.6% e 117.6%, con un valore massimo di deviazione relativa standard (RSD) pari al 5.3%, suggerendo una buona accuratezza e precisione del metodo (Tabella 2).

	Spiked level (µg/g)		
	11.33	141.64	509.82
	117.57	101.49	98.62
Recovery (%)			
RSD (%)	5.27	3.25	3.72

Tabella 2. Recuperi (%) dello stirene da bicchieri in polistirene

Il limite di determinazione è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere rivelata in un campione con un certo margine di sicurezza. Il LOD del sistema cromatografico è stato calcolato come il valore dell'analita pari a tre volte la deviazione standard del rumore di fondo ($S/N=3$) (Caulcutt and Boddy 1983). Il LOD è risultato pari a 0.049 µg/mL. Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato come la concentrazione dell'analita che da un segnale uguale ad almeno

10 volte il rumore di fondo del bianco; il LOQ calcolato per lo stirene è stato 0.147 µg/mL.

Quantizzazione

Il metodo è stato usato per quantificare lo stirene residuale in bicchieri di plastica per caffè ed acqua di undici diverse marche. L'estrazione da ciascun bicchiere è stata condotta in duplicato e l'analisi di ciascun estratto è stata condotta in triplicato. Il cromatogramma del bianco non ha mostrato alcuna interferenza nella zona di eluizione del nostro analita ne tantomeno nella zona dello standard interno, indicando una buona qualità del solvente e l'efficienza della procedura. In Figura 2b è mostrato un tipico cromatogramma usato per la quantificazione dello stirene; al fine di mostrare l'efficienza della procedura estrattiva il cromatogramma è comparato con quello relativo alla separazione cromatografica degli standard puri eluiti nelle stesse condizioni.

I livelli di stirene residuale estratto dai bicchieri di plastica sono riportati in Tabella 3.

I valori ottenuti sono oscillati in un range da 1.68 a 43.69 mg/100 g di bicchiere, a seconda del tipo di polistirene usato e della marca. Il più alto livello residuale (43.69 mg/100 g di bicchiere) è stato riscontrato nel Campione 6, rappresentato dal bicchiere in polistirene omopolimero, il quale differisce statisticamente ($p \leq 0.05$) dagli altri campioni. Quando comparato con gli altri, il bicchiere in polistirene espanso (campione 1, 1.68 mg/100 g) ha mostrato il più basso livello di monomero residuale per 100 grammi di bicchiere ($p \leq 0.05$). Livelli intermedi (9.44-29.94 mg/100 g di bicchiere) sono stati ottenuti dalle differenti marche di bicchieri in polistirene copolimero. Le notevoli differenze di contenuto in stirene possono essere correlate alla diversa manifattura. Il campione 11 ha mostrato il più alto livello (29.94 mg/100 g) di stirene del suo gruppo differendo dagli altri ($p \leq 0.05$), mentre i campioni 2, 3, 7, 8 e 10 non differiscono significativamente tra loro ($p \geq 0.05$) ma differiscono ($p \leq 0.05$) dagli altri. I campioni 4, 5 e 9 non differiscono

statisticamente tra loro ($p \geq 0.05$) nel livello di stirene ma differiscono da tutti gli altri (Tabella 3).

Numero campione	Stirene (mg/100 g)
1	1.68 ^e
2	17.52 ^c
3	21.91 ^c
4	9.44 ^d
5	10.66 ^d
6	43.69 ^a
7	20.70 ^c
8	19.00 ^c
9	7.86 ^d
10	19.07 ^c
11	29.94 ^b

I valori che mostrano la stessa lettera non differiscono statisticamente tra loro al test di Tukey ($p \leq 0.05$)

Tabella 3. Livelli di stirene residuale (mg/100 g) nei bicchieri in plastica

In un primo step del lavoro, il metodo è stato validato ed utilizzato per quantificare lo stirene residuale nei bicchieri; successivamente è stata valutata la possibile migrazione del monomero nel simulante alimentare considerato a diverse condizioni. La migrazione è stata valutata in acqua, a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 giorni ed a 100°C per 30 minuti, ed in una soluzione di etanolo al 20% (v/v), a 100°C per 30 minuti. Non è stata osservata migrazione sotto le condizioni studiate; questo potrebbe essere correlato al basso contenuto residuale nei bicchieri testati così

come alla bassa solubilità del monomero nei sistemi acquosi. I risultati potrebbero indicare inoltre che se migrazione è avvenuta, le concentrazioni sono al di sotto del LOD del metodo.

Ci sono molti pochi dati pubblicati sulla determinazione dei livelli di stirene residuale nei materiali a contatto con gli alimenti. Kush and Knupp (2002) hanno riportato uno studio sui residui di stirene in bicchieri in polistirene espanso (EPS), tedeschi ed australiani. I livelli sono risultati compresi tra 12.5 e 20.3 mg/100 g per i bicchieri tedeschi e compresi tra 4.18 e 6.57 mg/100 g per quelli australiani. I nostri risultati per il polistirene espanso sono stati inferiori rispetto a quelli descritti da Kush and Knupp (2002), ma rientrano nell'intervallo per quanto riguarda i bicchieri in polistirene copolimero. Choi et al. (2005) hanno riportato un valore di 254 µg/g in fogli di polistirene usati per l'imballaggio alimentare paragonabile a quello riscontrato da Baner (2000) di 224 µg/g; entrambi sono risultati prossimi ai valori riscontrati nei bicchieri analizzati.

Molti studi hanno riportato la possibile migrazione dello stirene dal polistirene in alimenti ed in simulanti alimentari. La migrazione dello stirene da tazze in polistirene in bevande calde (tè, latte e latte al cioccolato), disponibili nei market di Tehran è stata studiata da Khaksar et al. (2009). Inoltre, è stato valutato l'effetto di differenti parametri, come il contenuto di grasso, la temperatura ed il tempo di contatto. I livelli di migrazione dello stirene da tazze in polistirene trasparente oscillavano tra 0.61 e 8.15 µg/L per il tè caldo, tra 0.65 e 8.30 µg/L per il latte caldo e da 0.71 a 8.65 µg/L per il latte al cioccolato caldo; mentre i livelli di migrazione di stirene da tazze in polistirene opaco sono risultati in un range da 0.48 a 6.85 µg/L per il tè caldo, da 0.61 a 7.65 µg/L per il latte caldo e da 0.72 a 7.78 µg/L per il latte al cioccolato caldo a differenti condizioni di temperatura e tempi di contatto. I nostri risultati sono risultati diversi da quelli riportati da Khaksar et al. (2009), e questa differenza potrebbe essere correlata all'iniziale concentrazione ed al tipo di polimero, ed all'uso di un simulante alimentare anziché un sistema reale. Silva et

al. (2000) hanno riportato i livelli di migrazione dello stirene da bicchieri in plastica in acqua a differenti temperature e tempi di contatto, e valori di pH. Non è stata riscontrata migrazione dai bicchieri nell'acqua, ad eccezione dell'acqua a 80°C, i cui livelli oscillavano tra 2.07 e 9.03 µg/L a seconda del tempo di contatto. I nostri risultati non hanno mostrato migrazione dai bicchieri nell'acqua, come invece riportato da Silva et al. (2000), anche a temperature di 100 °C. Choi et al. (2005) hanno valutato la migrazione dai fogli di polistirene in n-eptano ed in acqua a differenti temperature (10-90°C) utilizzando un sistema GC-FID. Non è stata riscontrata migrazione dello stirene in acqua alle diverse temperature testate, in accordo con i nostri risultati, mentre tutto lo stirene residuale contenuto inizialmente è stato capace di migrare completamente in n-eptano durante le prime 72 h. La migrazione aumentava alle alte temperature.

Secondo Paraskevopoulou et al. (2011), non sono rivelabili i livelli di migrazione dello stirene da bicchieri in PS e in EPS quando l'acqua è usata come simulante alimentare e questo sarebbe attribuito alla scarsa solubilità dello stirene in acqua ed alle basse concentrazioni residuali. Nonostante le premesse, il monomero si è mostrato capace di migrare dai campioni in EPS in acqua alle alte temperature (60 °C) e per lunghi tempi di contatto ($t > 24$ h). In tale studio sono stati utilizzati come simulanti alimentari anche una soluzione acquosa di etanolo (75%, v/v) ed isoottano (sostituto dell'olio) a differenti temperature e per tempi di contatto da 30 minuti a 30 giorni. I livelli di stirene migrati nella soluzione di etanolo (0.122-1.49 mg/g) sono sempre stati maggiori rispetto a quelli in isoottano (0.064-1,027 mg/g) sia per i campioni in PS che in EPS.

I nostri risultati sono simili con quelli proposti da Paraskevopoulou et al. (2011) sia da campioni in PS che in EPS in acqua, ma anche a 100 °C nel nostro caso non si è osservata migrazione anche per il breve tempo di contatto (30 min); inoltre anche nella soluzione al 20% di etanolo a 100°C per 30 minuti non si è verificata migrazione. Questo potrebbe essere attribuito all'iniziale bassa concentrazione

residuale ed al tipo differente di bicchiere, oltre che alle diverse temperature per diversi tempi di contatto.

Verzera et al. (2010) hanno ricercato lo stirene in campioni di yoghurt proveniente da un'industria italiana immediatamente dopo la produzione e durante il periodo di conservazione a 4 °C. Livelli di stirene in tracce sono stati riscontrati subito dopo la produzione tendendo ad aumentare fino al valore di 15.9 ng/g dopo 23 giorni di conservazione. I valori sono risultati in accordo con quelli riportati da Nerin et al. (1998) in campioni di yoghurt spagnolo in contenitori polistirenici. Carrillo-Carrion et al. (2007) hanno determinato i livelli di stirene e di altri composti volatili in olio di oliva. La presenza è stata direttamente correlata con il tipo di materiale da imballaggio. L'olio di oliva in bottiglie di plastica ha mostrato il più alto contenuto di stirene, in un range compreso tra 2.29 e 102.8 ng/mL, il quale aumentava con il tempo di conservazione.

In Brasile, i materiali per il food packaging sono ampiamente diffusi per garantire la possibilità di scelta e per l'aumento nel preferire la convenienza ed il cibo veloce. Considerando i livelli di stirene nei bicchieri in polistirene studiati ed il loro largo uso da parte della popolazione brasiliana, vi è un continuo livello di esposizione su cui si deve indagare. Nonostante la presenza di monomero residuale nei bicchieri analizzati, non si è osservata migrazione dell'analita dal campione plastico al simulante alimentare, sotto le condizioni di temperature e di contatto studiate; questo significa che se la migrazione è avvenuta i livelli sono risultati al di sotto del LOD del metodo e che le condizioni di migrazione testate (40°C per 10 giorni e 100°C per 30 min) non hanno influenzato né incentivato la migrazione (Figura 3).

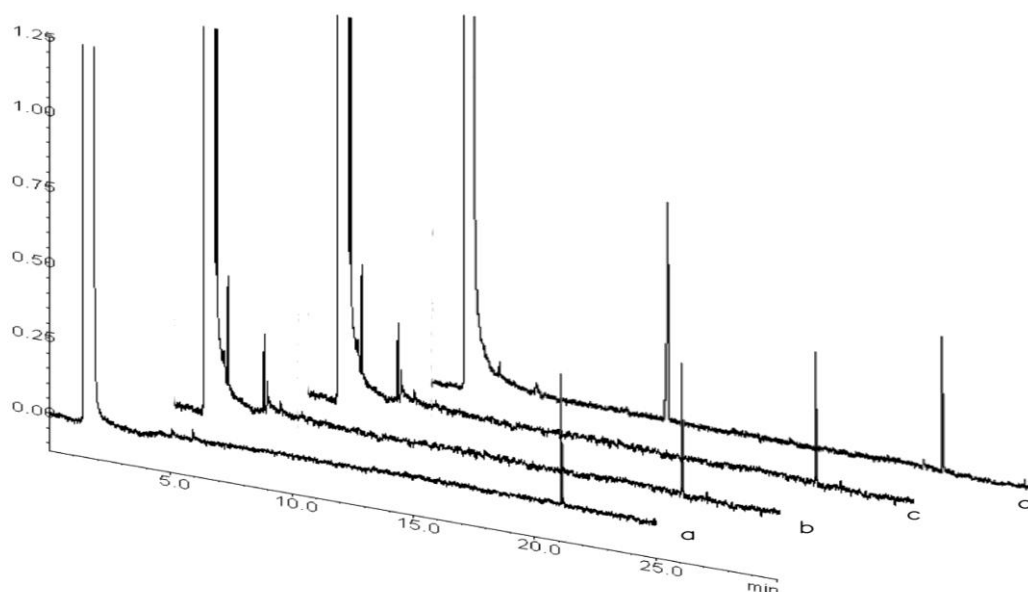


Figura 3. Cromatogrammi relativi ai test di migrazione condotti in: (a) acqua a 40°C per 10 giorni; (b) acqua a 100°C per 30 minuti; (c) etanolo al 20% (v/v) a 100°C per 30 minuti; (d) cromatogramma degli standard puri eluiti nelle stesse condizioni, per comparazione.

Deve essere sottolineato che tutti i bicchieri analizzati hanno mostrato un valore di stirene residuale inferiore rispetto al limite imposto dalla Legislazione brasiliana, che è di 250 mg/100 g di polimero plastico (ANVISA 1999). La Food and Drug Administration (FDA) richiede che la quantità di stirene residuale nei materiali in plastica polistirenica destinati a venire in contatto con alimenti grassi non sia superiore allo 0.5% (5.000 mg/kg) (FDA 2004; Verzera et al. 2010). Nessuna restrizione viene imposta per il monomero dal Regolamento europeo (EC 2011).

Conclusioni

Il metodo messo a punto ha mostrato un'ottima precisione ed accuratezza; può essere efficacemente usato per la determinazione dello stirene residuale in bicchieri monouso in plastica per acqua e caffè. Può inoltre essere usato per il controllo del contenuto di stirene nel polimero.

I livelli di stirene nei bicchieri sono oscillati tra 1.68 e 43.69 mg/100 g di bicchiere, a seconda del tipo di polimero e della marca analizzata.

Non è stata osservata migrazione del monomero dal bicchiere nel simulante alimentare considerato e sotto le condizioni di temperatura e contatto studiate; questo potrebbe essere dovuto al basso contenuto residuale, alla scarsa solubilità nel simulante alimentare o al LOD del metodo.

Ulteriori studi potrebbero mostrarsi interessanti nell'acquisire nuove informazioni circa la possibile migrazione dello stirene quando, nelle condizioni di temperatura e contatto testate, il simulante alimentare è sostituito con una matrice alimentare reale.

Bibliografia

Altria KD (2002) LC–GC Europe, p 1. Available: <http://www.lcgceurope.comm/>.

Arnedo-Pena A, Bellido-Blasco JB, Villamarin-Vazquez JL, Aranda-Mares JL, Font-Cardona N, Gobba F, Kogevinas M (2002) Acute health effects after accidental exposure to styrene from drinking water in Spain. *Scand. J. Work Environ. Health*

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), 1999. Regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Anexo XII. Determinação de monômero de estireno residual. Resolução no. 105, de 19 de maio de 1999. Available: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/105_99.htm. Accessed: 08 Nov 2011

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2007) Toxicological Profile for Styrene (Draft for Public Comment). U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA,140. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp53.pdf>. Accessed: 26 October 2011

Agencia de Florianópolis, Banco Regional de desenvolvimento do extremo sul (10/2006) Santa Catarina; Gerencia de Planejamento. Indústria de copos plásticos descartáveis

Baner AL (2000) Case study; styrene monomer migration into dairy products in single serve portion packs. In: Piringer OG, Banner AI, editors. Plastic packaging materials for food. Weinheim: Wiley-VCH 427-443

Carillo-Carrión C, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2007) Liquid-liquid extraction/headspace/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene, (o-, m- and p-) xylene and styrene in olive oil using surfactant-coated carbon nanotubes as extractant. *J Chromatogr A* 1171(1-2): 1-7

Caulcutt R, Boddy R (1983) Statistics for Analytical Chemistry. Chapman and Hall 253p

Cheery N, Gautrin D (1990) Neurotoxic Effects of Styrene: Further Evidence. *Br J Ind Med* 47: 29-37

Chiesa LM, Panseri S, Soncin S, Vallone L, Dragoni I (2010). Determination of styrene content in Gorgonzola PDO cheese by headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) and gas-chromatography mass-spectrometry (GC-MS). *Vet Res Commun* (2010) 34 (1):S167–S170. Doi 10.1007/s11259-010-9375-4

Choi JO, Jitsunari F, Asakawa F, Sun Lee D (2005) Migration of styrene monomer, dimmers and trimers from polystyrene to food stimulants. *Food Addit Contam* 22(7): 693-699

Collins DE, Richey FA Jr (1992) Synthetic organic chemicals. In: Kent, J.A., ed., Riegel's Handbook of Industrial Chemistry, 9th Ed., New York, Van Nostrand Reinhold, pp. 800–86

Currie LA (1999) Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal Chim Acta* 391: 105–126.

Ducruet V (1984) Comparison of the headspace volatiles of carbonic maceration and traditional wine. *Lebensmittel. Wissenschaft. Technol* (17) 217–221

EC (2004) EC Regulation No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC

EC (2011) EC Regulation No 10/2011 of the European Parliament and of the council of 14 January 2011 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing.

Eurachem Guide (1998) The fitness for purpose of analytical methods, Teddington, UK. Available: <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf/> Accessed 04 Nov 2011

FDA (Food and Drug Administration) (2004) Code of federal regulations (CFR): GPO

FDA (Food and Drug Administration) (2000) Total Diet Study. Summary of Residues Found. Ordered by Pesticide. Market Baskets 91-3–991, <http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/TDS1byps.pdf>

Gilbert J, Startin JR (1983) A survey of styrene monomer levels in foods and plastic packaging by coupled mass spectrometry-automatic headspace gas chromatography. *J Sci Food Agric* (34) 647–652

ILSI (International Life Sciences Institute) (05/2002) Polystyrene for Food Packaging Applications. In: Report on Packaging Materials. International Life Sciences Institute (ILSI) Europe Packaging Material Task Force, Belgium

IARC (International Agency for Research on Cancer) (2002) Styrene. World Health Organization, Lyon. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans 82: 437-550

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994) Styrene-7,8-oxide. World Health Organization, Lyon. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans 60: 321-346

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (2006) Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical Report). Appendix I: Requirements for individual parameters by which a Method may be characterised. Available: <http://www.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf/> Accessed 05 Nov 2011

Khaksar MR, Ghazi-Khansari M (2009) Determination of migration monomer styrene from GPPS (general purpose polystyrene) and HIPS (high impact polystyrene) cups to hot drinks. *Toxicol Mech Methods* 19(3): 257-261

Kolstad HA, Bonde JP, Spano M., Giwercman A, Zschiesche W, Kaae D, Roeleveld N (1999a) Sperm chromatin structure and semen quality following occupational styrene exposure. *Scand J Work Environ Health* 25(1): 70-73

- Kolstad HA, Bisanti L, Roeleveld N, Bonde JP, Joffe M (1999b) Time to pregnancy for men occupationally exposed to styrene in several European reinforced plastics companies. *Scand J Work Environ Health* 25(1): 66-69
- Kusch P, Knupp G (2002) Analysis of residual styrene monomer and other volatile organic compounds in expanded polystyrene by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J Sep Sci* 25:539–542. doi:10.1002/1615-9314(20020601)25:8<539:AIDJSSC539>3.0.CO;2-G
- Lanças FM (2004) Validação de Metodos Cromatograficos de Análise. Rima, Sao Carlos, 62p
- Law RJ, Fileman TW, Matthiessen P (1991) Phthalate esters and other industrial organic chemicals in the North and Irish seas. *Water Sci Technol* (24) 127–134
- Lickly TD, Breder CV, Rainey ML (1995) A model for estimating the daily dietary intake of a substance from food contact articles: styrene from polystyrene food contact polymers. *Regul Toxicol Pharmacol* 21: 406–417. doi:10.1006/rtph.1995.1055
- Lickly TD, Rainey ML, Burgert LC, Breder CV, Borodinsky L (1997) Using a simple diffusion model to predict residual monomer migration considerations and limitations. *Food Addit Contam* 14: 65–74
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1989) Survey of Styrene Levels in Food Contact Materials and in Foods. The Eleventh Report of the Steering Group on Food Surveillance. The Working Party on Styrene (Food Surveillance Paper No. 11), 2nd Ed., London, Her Majesty's Stationery Office
- Maarse H (1992a) Natural Occurrence and Routes of Formation of Styrene in Food (TNO Report No. B92.084), Zeist, TNO Nutrition and Food Research
- Maarse H (1992b) Quantities of Styrene in 6 Selected Food Products (TNO Report No. B92.553), Zeist, TNO Nutrition and Food Research
- Miltz J, Roosen-Doody V (1984) Migration of styrene monomer from polystyrene packaging materials into food simulants. *J Food Proc Preserv* 8:151–161. doi:10.1111/j.1745-4549.1985.tb00694.x
- Monteiro M, Nerin C, Rubio C, Reyes FGR (1998) A GC/MS method for determining UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. *High Resolution Chromatogr* 21: 317–320
- Murphy PG, MacDonald DA, Lickly TD (1992) Styrene migration from general purpose and high impact polystyrene into food simulating solvents. *Food Chem Toxicol* 30:225–232. doi:10.1016/0278-6915(92)90037-L
- Nerin C, Rubio C, Cacho J, Salafranca J (1998) Parts-per-trillion determination of styrene in yoghurt by purge-and-trap gas chromatography with mass spectrometry detection. *Food Addit Contam* 15: 346–354

Newhook R, Caldwell I (1993) Exposure to styrene in the general Canadian population. In: Sorsa M, Peltonen K, Vainio H, Hemminki K, eds, Butadiene and Styrene: Assessment of Health Hazards (IARC Scientific Publications No. 127), Lyon, IARC Press, pp. 27–33

NTP (National Toxicology Program) (2011) U.S. Department of Health and Human Services. Report on Carcinogens, 12th Edition 391-400. Available: <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=03C9AF75-E1BF-FF40-DBA9EC0928DF8B15/> Accessed: 10 Oct 2011

Oliviero M (1906) Reduction of cinnamic acid to cinnamene by moulds. *J Pharmacol Chim* (24) 62–64 (in French)

Papaleo B, Caporossi L, De Rosa M, Chiovato L, Ferrari M, Imbriani M, Signorini S, Pera A (2004) Esposizione professionale a distruttori endocrini: stato dell'arte. *G Ital Med Lav Erg* 26(3): 171-179

Paraskevopoulou D, Achilias DS, Paraskevopoulou (2011) Migration of styrene from plastic packaging based on polystyrene into food simulants. doi:10.1002/pi.3161

PIRA (2003) EU Project-Specific Migration. Determination of styrene in polystyrene materials. Method No. 22 Revision 1 04.03.2003, 1-6. Available: http://www.ivv.fraunhofer.de/no_html/22_PIRA_Styrene_CP.PDF/ Accessed: 31 Oct 2010

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC (2004) Validação em metodos cromatograficos e eletroforeticos. *Quim Nova* 27: 771–778.

Sanagi MM, Ling SL, Nasir Z, Ibrahim WA, Abu Naim A (2008) Determination of residual volatile organic compounds migrated from polystyrene food packaging into food simulant by headspace solid phase microextraction- Gas Chromatography. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 12 (3): 542–551

Silva FC, de Carvalho CR, de L Cardeal Z (2000) Solid- Phase Microextraction method for the quantitative analysis of styrene in water. *J Chromatogr Sci* 38(7): 315-318

Steele DH (1992) *The Determination of Styrene and Benzene in Selected Foods* (MRI Project No. 6450), Kansas City, MO, Midwest Research Institute

Steele DH, Thornburg MJ, Stanley JS, Miller RR, Brooke R, Cushman JR, Cruzan G (1994) Determination of styrene in selected foods. *J Agric Food Chem* (42) 1661–1665

Tang W, Hemm I, Eisenbrand G (2000) Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene. *Toxicology* 144:39–50. doi:10.1016/S0300-483X(99)00188-2

Tawfik MS, Huyghebaert A (1998) Polystyrene cups and containers: styrene migration. *Food Addit Contam* 15: 592–599

Vandenburg HJ, Gramshaw JW (1997) A rapid method for the determination of diffusion coefficients of migrants and prediction of migration from thermoset polyester using a dynamic headspace technique. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* 93: 52–56

Verzera A, Condurso C, Romeo V, Tripodi G, Ziino M (2010) Solid-Phase Microextraction Coupled to fast Gas Chromatography for the determination of migrants from Polystyrene-Packaging materials into Yoghurt. *Food Anal Methods* 3:80–384

WHO (World Health Organization) (2000) Air Quality Guidelines for Europe. WHO Regional Publications, European Series No. 91. Available: <http://www.euro.who.int/> Accessed: 31 October 2011

WHO (1983) *Styrene* (Environmental Health Criteria 26), Geneva, International Programme of Chemical Safety

4. Sviluppo di una procedura analitica per il controllo della melammina e composti correlati in integratori alimentari

4.1 La Melammina

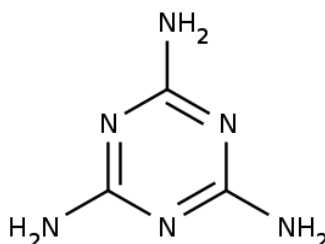


Figura 1. Struttura della Melammina

La melammina (MEL) o cianurammide (Figura 1) è un composto eterociclico azotato che a temperatura ambiente si presenta come un solido bianco cristallino molto poco solubile in acqua; fu scoperta nel 1834 da Liebig, ma il suo utilizzo industriale iniziò solo a partire dal 1940.

La melammina non viene considerata particolarmente tossica, ma non è comunque innocua e viene indicata nelle schede di rischio come pericolosa se ingerita, inalata o assorbita attraverso la pelle (Bradley 2005).

La melammina è un materiale molto versatile con un' elevata stabilità strutturale; il principale impiego di questo composto è nell'industria della plastica; è ampiamente utilizzata in combinazione con la formaldeide nella formazione di resine melamminiche molto resistenti. Tali resine sono usate nella produzione di pannelli, tessuti e colle, ma anche di articoli per la casa quali stoviglie, tovaglie, contenitori etc. La melammina costituisce anche il componente principale di adesivi, inchiostri, materie plastiche e calcestruzzo. È inoltre utilizzata come additivo ritardante di

fiamma per polipropilene e polietilene; la melammina cianurata è impiegata commercialmente come ritardante di fiamma per poliammidi e tereftalato; il fosfato di melammina è anche utilizzato come ritardante di fiamma per tereftalato.

La melammina è utilizzata anche in dispositivi per la rimozione della ruggine, per superfici metalliche pulite; come agente di incisione nel settore dei semiconduttori ed è un reagente in numerosi processi di fluorurazione .

Negli anni '50-'60 (Bradley 2005) **Errore. Il segnalibro non è definito.** era previsto un suo uso come fertilizzante per il suo elevato tenore in azoto; tuttavia, la reazione di idrolisi della melammina (che porta alla liberazione finale di azoto nel suolo) è molto lenta e ciò rende improponibile un suo uso come agente fertilizzante. Essa però rappresenta negli animali il metabolita principale di un pesticida, la ciromazina, utilizzato sui vegetali. La ciromazina (N-ciclopropil-1,3,5-triazina-2,4,6-triammina) può essere trasformato in melammina in seguito ad idrolisi a pH estremi, per metabolizzazione in piante fotosintetiche ed anche mediante reazioni di de-alchilazione in piante e/o animali.

Negli Stati Uniti nel 2007 la melammina è stata trovata in alimenti per cani e gatti, inserita in alcuni mangimi vegetali proteici e fraudolentemente etichettata come "glutine di frumento" o "concentrato di proteine del riso". Sembra che la melammina presente nei mangimi contaminati sia stata ottenuta per recupero dalle acque di processo il che ne rende il costo molto basso. Dal processo di produzione della melammina si origina un'acqua di scarico ad alto potere inquinante, per cui si procede ad una concentrazione dei residui solidi, che sono costituiti da circa il 70% di melammina e il 23% da composti analoghi (le ossitriazine ammelina, ammelide e acido cianurico). La composizione di tali residui solidi può variare in base alla tecnologia utilizzata nel processo di produzione.

Nel settembre del 2008 in Cina, alcuni alimenti per bambini risultarono contaminati con melammina. Anche in questo caso la melammina era stata aggiunta al latte per mascherare una frode di annacquamento finalizzata ad aumentare i volumi di

produzione. L'importante contenuto in azoto della melammina risultava efficace nel simulare, nonostante l'annacquamento, il tenore proteico tipico del latte.

Poiché è possibile che questa sostanza venga utilizzata, sempre per aumentare il valore proteico, anche nelle sieroproteine o in altre proteine del latte, la FDA (Food and Drug Administration) americana ha pubblicato un avvertimento pubblico riguardante la potenziale contaminazione con melammina di ingredienti derivati dal latte, come latte intero o magro in polvere, siero di latte in polvere e lattosio in polvere, ingredienti utilizzati in dolci, bevande e snack, ma anche in barrette proteiche e integratori alimentari.

L'aumento del valore proteico che la melammina apporterebbe ai prodotti adulterati è strettamente legato alle tecniche di quantizzazione delle proteine nei prodotti alimentari, che si basano sul calcolo del loro tenore d'azoto (metodo Dumas e metodo Kjeldahl).

Entrambe queste tecniche analitiche si basano sulla misurazione delle quantità di azoto totale contenute in un determinato campione alimentare. Tuttavia le misurazioni possono essere falsate se all'interno del prodotto alimentare da analizzare sono addizionate delle sostanze chimiche, diverse dalle proteine, ma contenenti azoto, come appunto la melammina.

4.1.1 Effetti tossici della melammina

Al momento si sa ancora poco sulla tossicità acuta della melammina nell'uomo, anche perché non sono stati riportati casi di intossicazione acuta imputabili direttamente a tale sostanza (Ministero Della Salute 2009).

Invece la tossicità, sia acuta che cronica, negli animali, è stata studiata e i sintomi sono inappetenza e perdita di peso, calcoli vescicali ed eliminazione di cristalli di melammina con le urine, fino a blocco renale e morte.

Per quanto riguarda la tossicità cronica nell'uomo si può affermare che l'assunzione di melammina ha effetti collaterali importanti, come vasocostrizioni, gravi infiammazioni, calcoli, insufficienza renale e alterazioni del DNA. La tossicità comunque dipende dal peso della persona e dalla quantità ingerita.

I primi sintomi di una intossicazione cronica da melammina sono: irritabilità, ipertensione depressione, letargia, vomito, diarrea, perdita di appetito, cambi improvvisi nell'assunzione di acqua, disuria, tracce ematiche nelle urine e primi segni di infezione renale.

La tossicità sembra essere esaltata (effetti additivi e sinergici) dalle interazioni in vivo tra melammina e composti analoghi (es. acido cianurico, con cui forma il relativo cianurato). Il problema principale consiste dunque non nella tossicità assoluta della melammina, piuttosto bassa, ma nelle interazioni ioniche in vivo con alcune molecole analoghe, potenzialmente presenti nella dieta, che ne riducono la solubilità e portano alla formazione di cristalli. Questi piccoli cristalli possono ostruire i tubuli renali provocando un blocco renale ed in alcuni casi la morte.

Per esempio la melammina e l'acido cianurico formano una struttura molto ordinata tenuta insieme da più legami idrogeno tra ogni coppia di molecole (Figura 2). Questo complesso è praticamente insolubile in acqua.

Nei lattanti umani (Europass 2010), ai quali è stato somministrato latte artificiale adulterato con una preparazione relativamente pura di melammina, i cristalli sono risultati costituiti da complessi di melammina con l'acido urico che si trova naturalmente nelle urine.

La formazione dei cristalli di melammina-acido urico è fortemente dipendente dal pH e si verifica più facilmente intorno a pH 5.5.

Gli esseri umani possono essere più sensibili alla co-precipitazione di melammina con l'acido urico perché espellono più acido urico nelle urine rispetto alla maggior

parte dei mammiferi a causa della mancanza dell'enzima urato ossidasi, e anche perché il pH urinario è inferiore a quello di altre specie, come i roditori.

Nei neonati, l'escrezione di acido urico nelle urine è più alta che negli adulti, questo accresce la pericolosità della melammina per questa classe di consumatori.

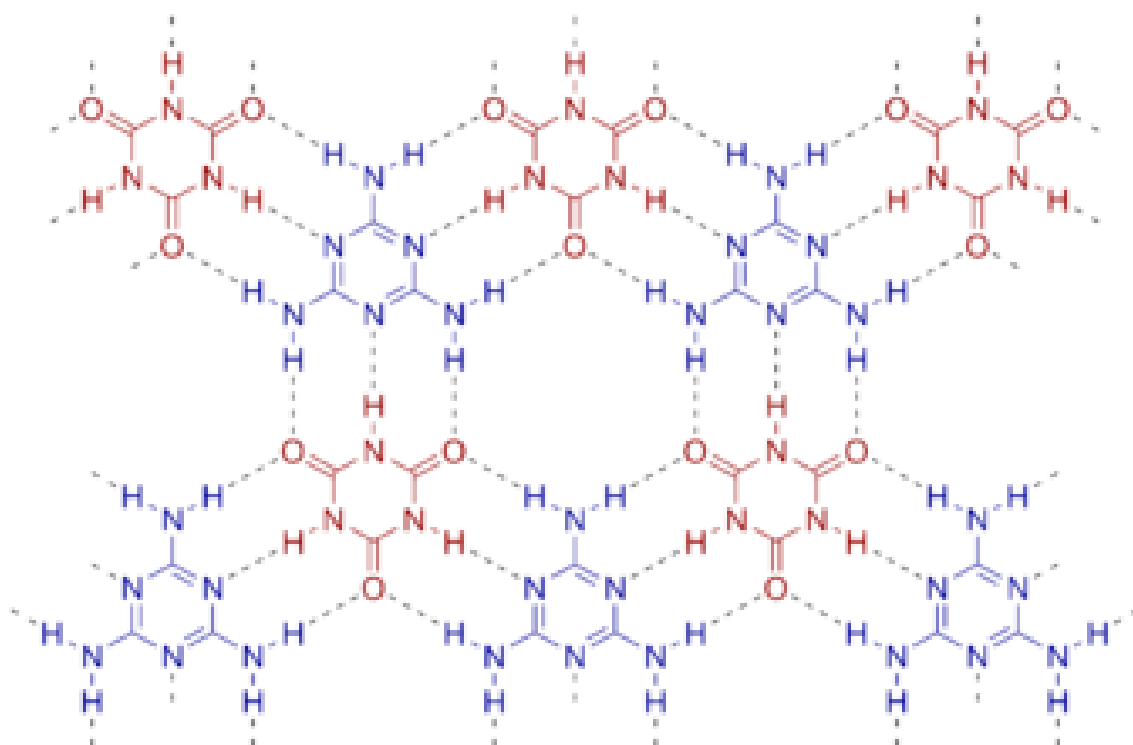


Figura 2. Struttura dei cristalli di Melammina – Acido Cianurico

L'uomo può venire a contatto con la melammina in diversi modi e a diverse concentrazioni (WHO 2009).

Una possibile esposizione orale deriva dal fatto che i materiali a base di resina melamminica a contatto con alimenti rilasciano melammina sia a breve termine (monomeri residui liberi), sia a lungo termine (decomposizione del polimero). La cessione (CNSA 2008) avviene generalmente a livelli inferiori ai 30 mg/kg di matrice alimentare, ma si accompagna anche ad una significativa cessione di formaldeide (anche oltre 15 mg/kg di matrice alimentare).

La melammina è un importante metabolita ambientale dell'erbicida ciromazina nelle piante, ma non ci sono dati sufficienti a stimare la possibile esposizione dei consumatori a melammina e derivati attraverso l'uso di erbicidi.

Un' esposizione professionale può verificarsi per inalazione e contatto cutaneo con questo composto nei luoghi di lavoro dove viene prodotta o utilizzata la melammina.

Ovviamente la principale via d'esposizione per l'uomo è data dall'ingestione di melammina e simili mediante l'assunzione di cibi adulterati.

A seguito dei casi di contaminazione fraudolenta di latte artificiale con melammina in Cina, la Commissione Europea adottò la Decisione 2008/757/CE, poi sostituita dalla decisione 2008/797/CE, che individuava un tenore massimo di melammina (TDI: Tolerable Daily Intake; dose media giornaliera tollerabile) pari a 1 mg/kg nelle formule per l'infanzia e a 2,5 mg/kg nei prodotti composti contenenti latte e prodotti lattieri. Tale valore era stato stabilito in base al parere EFSA del 24 settembre 2008 e al documento della WHO "melanine and cyanuric acid: toxicity, preliminary risk assessment and guidance on levels in food" del 25 settembre 2008 (WHO 2008).

Oggi, considerando il NOEL e numerosi elementi di incertezza (differenze di cinetica fra le diverse specie, suscettibilità legata all'età, interazioni fra melammina e acido cianurico, possibili fattori predisponenti legati a patologie renali, uso di diuretici, ecc.) la WHO ha definito un nuovo TDI per la melammina, pari a 0,2 mg/kg p.c. (corrispondente a 12 mg/die per un soggetto di 60 kg e 4 mg/die per un bambino di 20 kg). La WHO ha dichiarato comunque, che i limiti definiti da molti paesi di 1 mg/kg nelle formule per l'infanzia e 2,5 mg/kg negli altri alimenti fornirebbero un margine di sicurezza sufficiente (WHO 2009).

Invece il limite massimo di migrazione (LMS) di melammina consentito, dai materiali e dagli oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti, per i quali è

autorizzato l'utilizzo di melammina dalla direttiva 2002/72/CE, è stato stabilito essere di 30mg/kg negli alimenti, anche se, alla luce di recenti studi di tossicità, tale limite non appare cautelativo nei confronti della salute del consumatore (Ministero Della Salute 2009).

I dati sul metabolismo della melammina sono frammentari (Ministero Della Salute 2009):

la melammina, analogamente ad altre S-triazine, viene metabolizzata in varia misura da componenti della flora batterica del suolo dando origine a derivati mono-, di, e tri-deaminati/idrossilati ammelina, ammelide ed acido cianurico (Figura 3); a sua volta l'acido cianurico viene ulteriormente degradato a biureto, allofanato ed ammoniaca da enzimi della flora microbica.

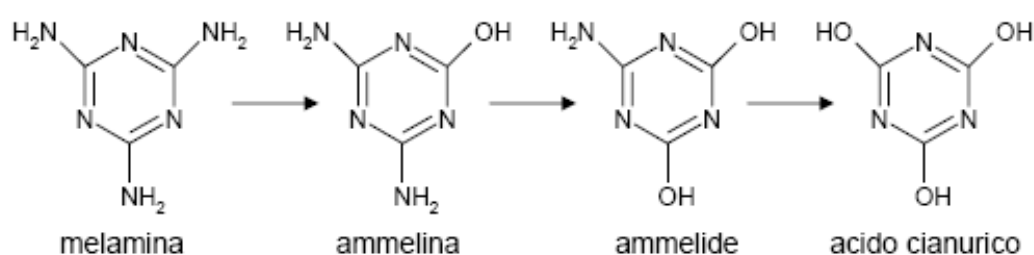


Figura 2. Idrolisi Melammina

E' verosimile pensare che un analogo processo possa avvenire a livello intestinale o ruminale.

Un studio condotto in suini trattati per via e.v. con un'unica dose di melammina (6,13 mg/kg p.c.) ha confermato la rapida cinetica di eliminazione del composto senza peraltro fornire dati sull'eventuale genesi di metaboliti.

In gatti sperimentalmente esposti ad una miscela di melammina e acido cianurico, non sono stati rinvenuti residui di ammelina o ammelide in ambito renale in quantità superiori al limite di rilevazione, peraltro piuttosto elevato (5 mg/kg) (Puschner et al. 2007).

La liberazione di ammoniaca a livello ruminale in bovini ai quali era stata aggiunta melammina nella razione ed esperimenti in vitro condotti incubando il derivato triazinico con fluido ruminale confermano l'ipotesi di un metabolismo idrolitico della melammina quale quello prospettato in Fig. 3, con la liberazione di composti quali ammelina, ammelide e acido cianurico (Ministero Della Salute 2009).

Per tali metaboliti vi è prova di una relativa biodisponibilità nell'uomo, negli animali domestici (Puschner et al. 2007; Reimschuessel et al. 2008) e nel ratto (Anderson et al. 2008).

4.2 Composti correlati alla Melammina (Figura 4)

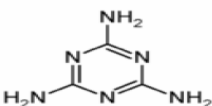
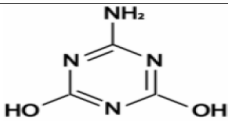
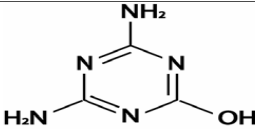
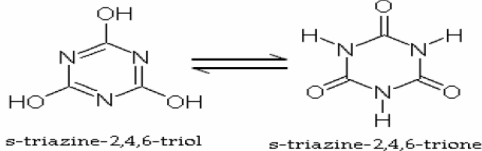
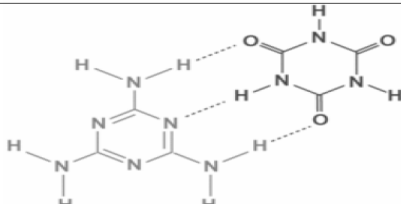
Formule di struttura di melammina e composti analoghi	
	Melamina 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine CAS 108-78-1 Formula bruta C ₃ H ₆ N ₆ Peso Molecolare 126.12
	Ammelide 6-Amino-2,4-Dihydroxy-1,3,5-Triazine CAS 645-93-2 Formula bruta C ₃ H ₄ N ₄ O ₂ Peso molecolare 128.09
	Ammelina 4,6-Diamino-2-Hydroxy-1,3,5-Triazine CAS 645-92-1 Formula bruta C ₃ H ₅ N ₅ O Peso molecolare 127.11
 s-triazine-2,4,6-triol s-triazine-2,4,6-trione	Acido Cianurico (forme in equilibrio) s-triazine -2,4,6- triol s-triazine-2,4,6-trione CAS 108-80-5 Peso molecolare 129.09
	Interazioni ioniche (rappresentate dalle linee tratteggiate) tra melamina e acido cianurico, per la possibile formazione di cristalli

Figura 3. MARC

Tenendo presente il profilo d'idrolisi della melammina è facile ipotizzare che se essa è presente in matrici alimentari, nell'organismo, dopo la sua assunzione, possano ritrovarsi anche i suoi metaboliti ammelina, ammelide ed acido cianurico; inoltre a seconda del processo di depurazione, la melammina può contenere diversi livelli di sostanze strutturalmente affini, quali i MARC (Europass 2008).

Residui di acido cianurico possono trovarsi negli alimenti anche come conseguenza dell'utilizzo di dicloroisocianurati come fonte di cloro attivo negli agenti di disinfezione.

Infine, sia la melammina che l'acido cianurico possono essere presenti come impurità nei mangimi a base di urea per i ruminanti.

Le informazioni attualmente disponibili non consentano l'identificazione di un fattore per il quale viene aumentata la tossicità dalla co-esposizione, seppure vi siano dati certi dell'aumento della tossicità della melammina in presenza di altri MARC.

Considerato che la struttura reticolare dei cristalli rinvenuti nei tubuli renali dopo assunzione di cibo contaminato, dipende da legami idrogeno tra i corrispondenti gruppi ossidrilici e amminici di triazine appaiate, è probabile che l'ammelide possa sostituire, sia pure in modo imperfetto, l'acido cianurico nel reticolo quando la melammina è presente in eccesso. Allo stesso modo, ci si potrebbe aspettare che l'ammelina possa sostituire la melammina se l'acido cianurico fosse presente in eccesso (Dobson et al. 2008).

Per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione dell'uomo, la FDA ritiene che sia improbabile che esso possa venire in contatto con livelli di contaminazione di melammina quali quelli rilevati nei mangimi. Lo scenario più conservativo ipotizzato assume la presenza di residui di melammina e acido cianurico a livello di 100 ppb in tutti gli alimenti solidi consumati da una persona di 60 kg nell'arco di un giorno (circa 1500 g). pari a 2,5 µg/kg peso vivo/giorno.

Tuttavia, rimane aperto il problema della tossicità determinata dalle possibili interazioni in vivo tra melammina, composti analoghi, eventuali contaminanti di processo e acido cianurico (effetti additivi e sinergici). Tale punto costituisce la più importante criticità nella valutazione tossicologica.

Esiste inoltre l'aspetto derivante dalla possibile interazione della melammina con altri costituenti della razione alimentare.

Sono documentate le interazioni tra melammina e acido cianurico e formaldeide; questi ultimi negli USA possono essere ancora utilizzati in alcuni casi come additivi zootecnici. Tale interazione comporterebbe una minore solubilità della melammina e favorirebbe la precipitazione di cristalli.

4.2.1 Ammelide (Figura 5)

L'ammelide (6-Amino-2,4-Dihydroxy-1,3,5-Triazine) è una triazina prodotta dall'idrolisi dell'ammelina.

L'ammelide può essere ottenuta dal riscaldamento di diciandamide con ammoniaca acquosa a 160-170°C. Può anche essere sintetizzata dal riscaldamento di melam (N2-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine) con acido solforico concentrato per un breve periodo a 190°C.

L'ammelide forma sali sia con acidi (acido cloridrico, acido nitrico, acido solforico) che con basi (idrossido del sodio, ammonio, idrossido di calcio).

L'ammelide non ha una tossicità acuta e non ha indotto tossicità subcronica, quando somministrato agli ovini per 6 settimane in dosi di 372 mg / kg di peso corporeo al giorno.

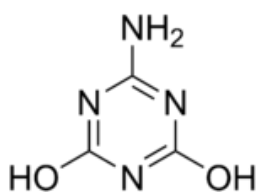


Figura 5. Struttura Ammelide

4.2.2 Ammelina (Figura 6)

L'ammelina (4,6-diammino-2-idrossi-1,3,5-triazina) è un triazina. È il prodotto d'idrolisi della melammina.

L'ammelina può essere sintetizzata dalla pirolisi dell' urea, o mediante una reazione di condensazione di 2 moli di diciandiamide con 1 mole di biureto.

L'ammelina è debolmente acida con $pK_a \sim 9$. Può formare sali con nitrato, solfato, cromo e ossalato. L'ammelina bollente reagisce con acido cloridrico diluito a formare melam e ammoniaca.

L'assunzione media giornaliera di 296 mg di ammelina / kg di peso corporeo al giorno e 97 mg di una miscela di ammelina e ammelide / kg di peso corporeo nella dieta da parte di pecore ha causato la morte di metà degli animali.

Non è disponibile nessun altro dato sulla tossicità di ammelina o ammelide per bestiame, pesci e animali domestici.

Le basi di dati tossicologici per ammelide e ammelina sono estremamente limitate e quindi non si è potuta stabilire una DGA.

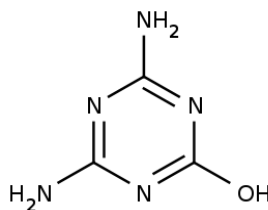


Figura 6. Struttura Ammelina

4.2.3 Acido Cianurico (Figura 7)

L'acido cianurico o 1,3,5-triazina-2,4,6-triolo è un composto chimico con la formula $(\text{CNOH})_3$.

È un solido bianco inodore, usato come precursore o componente di sbiancanti, disinfettanti ed erbicidi. L'acido cianurico è classificato come "sostanza tossica". Il 50% della dose orale letale (LD50) è 7.700 mg / kg nel ratto.

L'acido cianurico fu sintetizzato per la prima volta da Wöhler nel 1829, mediante decomposizione chimica dell'urea e acido cianurico. La sintesi corrente su scala industriale comporta la decomposizione termica dell'urea, con rilascio di ammoniaca.

Si può produrre acido cianurico per idrolisi di melammina grezza o di scarto, seguita da cristallizzazione. I rifiuti acidi provenienti da impianti che producono questi materiali contengono acido cianurico e, occasionalmente, triazine amino-sostituite disciolte (vale a dire ammelina, ammelide, e melammina).

L'acido cianurico è usato principalmente come precursore di N-clorurati cianurati. Il derivato diclorurato è tipicamente convertito nel suo sale sodico (sodio dicloro-s-triazinetriene). Clorurazioni ulteriori danno acido tricloroisocianurico. Questi composti N-clorurati servono come disinfettanti e algicidi per l'acqua delle piscine. Si stabilizza così il cloro impedendo che sia consumato velocemente dalla luce solare.

A causa della sua trifunzionalità, l'acido cianurico è anche un precursore di agenti di reticolarizzanti, soprattutto per le resine poliuretaniche

Un'esposizione orale non alimentare all'acido cianurico è stata evidenziata nelle piscine ove si usano cloroisocianurati per la clorazione dell'acqua, che si decompongono in cloro e acido cianurico. È stato stimato che l'ingestione di acqua di piscine è doppia nei bambini rispetto agli adulti (approssimativamente 37 ml dopo 45 minuti di attiva permanenza in piscina), per cui è nuovamente la salute dei più piccoli ad essere maggiormente a rischio.

La valutazione della concentrazione di acido cianurico viene comunemente fatta con un test turbidimetrico che utilizza la melammina come reagente per precipitare l'acido cianurico.

Le scarse informazioni disponibili sul metabolismo per l'acido cianurico indicano, comunque, un rapido assorbimento e una rapida eliminazione attraverso le urine, con poca o nessuna biotrasformazione, analogamente a quanto avviene per la melammina.

Per l'acido cianurico esiste una TDI di 1,5 mg/kg di peso corporeo sulla base di una precedente valutazione del disinfettante dicloroisocianurato.

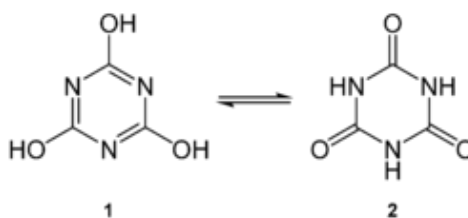


Figura 7. Struttura Ac. Cianurico

4.2.4 Melamina cianurata (Figura 2)

Cianurato di melamina, noto anche come addotto acido cianurico-melamina o complesso melamina- acido cianurico, è un complesso cristallino formato da una miscela 1:1 di melamina e acido cianurico.

La sostanza non è un sale, il complesso è tenuto insieme da una vasta rete bidimensionale dei legami a idrogeno tra i due composti, che ricorda quella vista nelle basi del DNA.

La formazione di questi cristalli in soluzioni acquose è stata indicata come la causa della tossicità, a carico del sistema urinario, di alcuni alimenti per animali domestici nel 2007 e successivamente di latte in polvere di origine cinese nel 2008 (Puschner et al. 2007).

4.3 Parte Sperimentale

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica estrattiva e analitica in grado di determinare quali - quantitativamente la melammina ed i composti ad essa correlati (MARC) in integratori proteici in polvere.

In particolare è stata ottimizzata la fase estrattiva, al fine di ottenere buoni recuperi dei quattro analiti, e quindi è stato studiato un metodo HPLC in grado di separare e rilevare contemporaneamente i quattro composti.

La scelta della fase stazionaria e della miscela eluente sono state effettuate tenendo conto di dover separare composti strutturalmente molto simili tra loro.

Scelta della matrice

La matrice di partenza è rappresentata da un integratore proteico.

Gli integratori alimentari, come definiti dal decreto n. 169/2004 art.2 (GU 2004), sono prodotti destinati ad integrare la dieta normale e costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive (vitamine e minerali) o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico (amminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale), sia monocomposti che pluricomposti, in forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale, flaconi a contagocce e altre forme simili, di liquidi e polveri destinati ad essere assunti in piccoli quantitativi unitari. Gli integratori alimentari, è sottolineato nel decreto, devono utilizzare solo vitamine e minerali elencati nell'Allegato I e nelle forme indicate nell'Allegato II dello stesso decreto.

La scelta di un integratore proteico come matrice nel nostro studio è stata effettuata tenendo conto dell'esponenziale aumento nel consumo di tali prodotti.

L'uso degli integratori alimentari, e di quelli proteici in particolare, è altamente diffuso tra tutte le fasce di età e categorie sociali. La mancanza di una legislazione specifica per l'uso di tali supplementi, un superficiale controllo nella vendita di tali articoli e la sopravvivenza di un metodo aspecifico quale il Kjeldhal per la

determinazione del contenuto proteico, fanno di questi integratori alimentari un facile bersaglio per l'aggiunta fraudolenta di melammina e di composti correlati.

Preparazione del campione

- **Fase di estrazione e separazione degli analiti dalla matrice**

0,5 g di integratore sono trattati con 10 mL di EtOH; si agita con vortex per 1 minuto e successivamente si centrifuga per 15 minuti a 2500 rpm.

Il surnatante è scartato ed al residuo sono addizionati 10 mL di una miscela acetonitrile/NaOH 0.01 M in rapporto 50:50. Si agita con Vortex per 1 minuto e successivamente si centrifuga a 2500 rpm per 30 minuti. Si preleva il surnatante e lo si filtra su filtri Millex 0,22 µ.

A questo punto si procede all'analisi del campione mediante HPLC.

- **Preparazione dei campioni arricchiti**

Al fine di valutare i recuperi, sono stati preparati campioni arricchiti di integratore proteico, precedentemente testato per verificare l'assenza dei MARC, con concentrazioni di 0,5-5-10 µg/mL per MEL AMN AMD e di 5-50-100 µg/mL per CYA. Per la preparazione dei campioni arricchiti, sono state utilizzate soluzioni preparate diluendo opportunamente con acqua le soluzioni madre di ciascuno standard in ACN/NaOH 0.05 M. Dalle soluzioni così preparate sono state prelevate le opportune quantità da aggiungere a campioni costituiti da 0.5 g di integratore, al fine di ottenere le concentrazioni finali dei quattro MARC riportate sopra. Ciascun campione è stato sottoposto alla procedura di estrazione descritta precedentemente.

- **Preparazione dei campioni di controllo**

A 0,5 grammi di integratore, precedentemente analizzato per verificare l'assenza di MARC, è stato addizionato 1 mL di ACN/NaOH 0.05 M (50:50 v/v), al fine di mimare le stesse condizioni di preparazione dei campioni arricchiti. Anche i

campioni di controllo sono stati sottoposti alla procedura di estrazione descritta precedentemente.

L'estrazione di ciascun campione arricchito e di controllo è stata condotta in triplicato, e l'analisi di ciascun estratto ottenuto è stata ripetuta tre volte.

Analisi mediante HPLC

L'analisi cromatografica (HPLC) è stata eseguita con strumentazione Thermo Finnigan®: degasatore in linea a quattro vie, pompa quaternaria a doppio pistone reciprocante, iniettore Rheodyne modello 7125, rivelatore a fotodiodi Finnigan Spectra System UV 6000 LP.

I cromatogrammi sono stati acquisiti utilizzando il software gestionale Chromquest 4.2.34.

In una prima fase del lavoro è stata studiata quale fase stazionaria potesse assicurare la migliore separazione dei quattro composti che vantano tra loro notevoli similitudini strutturali.

Sono state testate diverse colonne cromatografiche (Nucleodur, Synergi 4 HIDRO RP, Vydac, Kinetex HILIC, Spherex 5OH (DIOL) e solo la fase stazionaria C18 funzionalizzata con gruppi alcolici (Spherex 5OH Diol 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, Phenomenex, California, USA) si è dimostrata efficace nel permettere una perfetta separazione cromatografica dei quattro analiti (Figura 8), in accordo con quanto riportato da altri autori sull'uso di fasi inverse funzionalizzate con gruppi polari (Tolleson et al. 2008; Esteban 2007; Muniz-Valencia et al. 2008; Ishiwata et al. 1987; Ehling et al. 2007; Gratz et al. 2009; Sancho et al. 2005; Chou et al. 2003),.

Un simile studio è stato effettuato anche sulla miscela eluente da utilizzare durante l'analisi HPLC; il sistema binario acqua/acetonitrile, in rapporto 95:5, si è dimostrato efficace nel garantire le giuste interazioni tra i composti analizzati e la fase stazionaria.

Per l'analisi HPLC dei quattro analiti è stata utilizzata una metodica isocratica che prevede l'impiego di una miscela binaria di solventi con velocità del flusso regolata a 0.80 mL/min.

La rivelazione dei MARC è stata effettuata settando la lunghezza d'onda a 220 nm. L'uso del DAD come sistema di rivelazione offre il vantaggio di ottenere un profilo di assorbimento del picco cromatografico per confermarne l'identità (Ehling et al. 2007).

Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) senza l'ausilio di particolari strumenti di termostatazione.

Nelle condizioni sperimentali citate, i tempi di ritenzione (t_r) dei quattro contaminanti analizzati sono stati: ammelina 4.50 ± 0.04 min, melamina 5.0 ± 0.1 min, acido cianurico 8.9 ± 0.30 min e ammelide 9.6 ± 0.30 min.

I campioni di controllo sono stati assunti come bianco ed usati sia per verificare l'assenza di picchi interferenti e sia, dopo fortificazione, per confermare l'identità dei picchi, la precisione del metodo ed i recuperi.

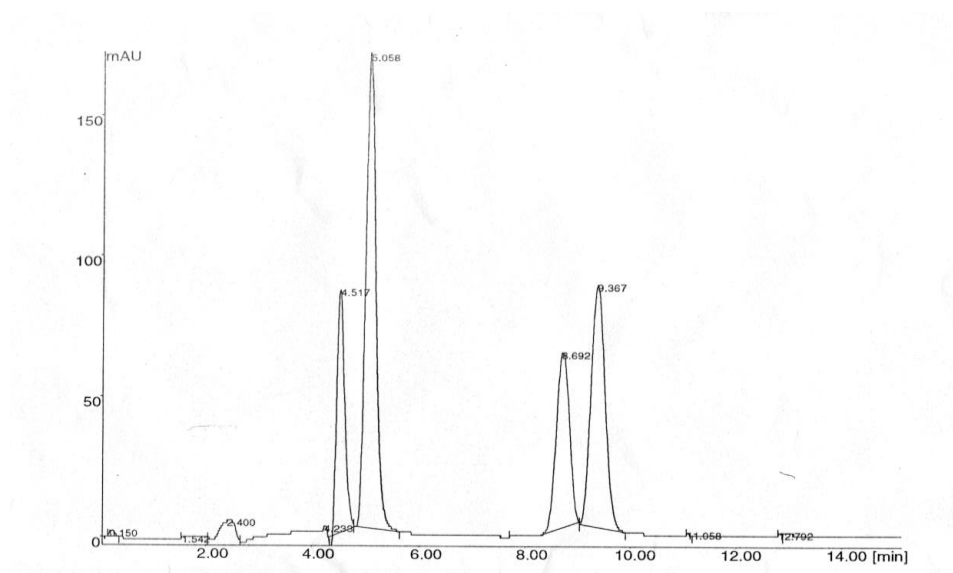


Figura 8. Cromatogramma di una soluzione standard di MEL, AMN ed AMD a concentrazione 5 µg/mL e di CYA 50 µg/mL

- **Validazione del metodo**

L'uso dell'UV e del DAD richiede una validazione del metodo accurata per confermare che non ci siano interferenze che assorbano alle lunghezze d'onda usate dal detector, che oscillano in un range compreso tra 200 e 270 nm (Ishiwata et al. 1987; Bradley et al. 2005; Kim et al. 2008; Muniz-Valencia et al. 2008; Ehling et al. 2007; FSIS 1991; Miller et al. 1996; Patakioutas et al. 2007) e settata generalmente intorno a 214 nm.

Per la determinazione quantitativa dei MARC è stato utilizzato il metodo dello standard esterno che ci ha permesso di costruire una retta di calibrazione per ciascuno dei quattro composti usando standard dei singoli analiti a differenti concentrazioni.

Sono state preparate cinque soluzioni di melammina, ammelina e ammelide a concentrazioni crescenti nell'intervallo 0,5-10,0 µg/mL; mentre per l'acido cianurico il range varia tra 5 e 100 µg/mL. Dal momento che l'acido cianurico è un cattivo cromoforo rispetto agli altri composti analizzati, melammina, ammelina e ammelide, in accordo con quanto riportato in letteratura, tutte le soluzioni standard dovrebbero rispettare il rapporto di concentrazione 1:1:1:14 (Ehling et al. 2007).

La curva di calibrazione di ciascuno dei quattro composti è stata costruita correlando l'area del picco cromatografico, ottenuta dopo ogni iniezione degli standard con la rispettiva concentrazione. Ogni valore della curva è la media di tre iniezioni. Per ciascuna delle quattro reti, si è ottenuto un alto coefficiente di determinazione (R^2) all'interno del range di concentrazioni considerato. Infatti i coefficienti di correlazione sono compresi nell'intervallo da 0,9971 a 0,9999 (0,9971 per MEL, 0,9999 per AMN, 0,9996 per AMD e 0,9981 per CYA).

Per la costruzione della curva di calibrazione è stata iniettata una quantità di soluzione standard pari a 60 µL, ossia tre volte il volume del loop.

I recuperi dei quattro analiti sono stati calcolati sui campioni arricchiti di integratore proteico in concentrazione compresa tra 0,5-10 µg/ml per MEL, AMN e AMD, e tra 5-100 µg/mL per CYA. I recuperi dei MARC calcolati sono risultati compresi in un range del 79-85% a seconda dell'analita (MEL 81%, AMN 79%, AMD 83% e CYA 85%).

Per l'analisi quantitativa, le procedure di calibrazione sono state condotte utilizzando le soluzioni standard dei quattro analiti; le iniezioni sono state ripetute ogni due giorni ed in questo periodo il coefficiente di variazione (CV) registrato è stato inferiore dello 0.5%.

Le diluizioni dalle soluzioni standard sono state analizzate in HPLC immediatamente dopo la preparazione e durante l'analisi non si è osservata la formazione di alcun prodotto di degradazione.

Tutte le procedure di validazione del metodo sono state effettuate utilizzando come colonna la Spherex 5 OH (Diol).

La precisione del metodo è stata valutata attraverso la ripetibilità, eseguendo sei analisi replicate nello stesso giorno (intra-day), e la precisione intermedia, eseguendo le analisi in dieci giorni differenti (inter-day). La deviazione standard relativa intra-day (R.S.D) è risultata in un range tra 0.23-2.68% e la deviazione standard relativa inter-day (R.S.D.) nel range 0.31-3.39% per le concentrazioni degli standard considerate.

Il limite di rivelabilità (LOD) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$\text{LOD}=3.3 \sigma_B/b$$

dove σ_B è la deviazione standard del bianco e b è l'intercetta.

Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$\text{LOQ} = 10 \sigma_B/b$$

I LOD e i LOQ calcolati sono risultati compresi rispettivamente nel range 0.096-0.12 µg/mL, e 0.32-0.4 µg/mL per MM, AMN e AMD. Per il CYA, in accordo con quanto riportato in letteratura (Ehling et al. 2007), si sono registrati LOD e LOQ più elevati, rispettivamente di 0.5 e 4.5 µg/mL. I valori ottenuti sono paragonabili a quelli riportati in letteratura per metodi HPLC-DAD.

In Figura 9 è riportato il cromatogramma ottenuto da un campione di integratore fortificato con un mix dei quattro analiti, a concentrazione 5 µg/mL per MM, AMN e AMD e 50 µg/mL per CYA, e sottoposto alla fase di purificazione e di estrazione del campione; il cromatogramma mostra chiaramente come il trattamento del campione con etanolo, necessario per la precipitazione e l'allontanamento, dalla matrice, della quota proteica, e la successiva estrazione con acetonitrile/NaOH 0.01M 50:50 (v/v), indispensabile per il recupero dei quattro analiti, permetta di ottenere un campione che non mostra interferenze nella zona di eluizione dei composti.

L'estrazione con ACN/NaOH 0.01 M ci ha permesso inoltre di ottenere un campione che possa essere direttamente iniettato all'HPLC, previa filtrazione su filtro Millex 0,22 µ al fine di allontanare eventuali residui in sospensione.

Sembra inoltre che MEL e CYA non si associno per formare il cianurato di melamina in acetonitrile/acqua (Filigenzi et al. 2008) e che la formazione del complesso MEL-CYA può essere prevenuta, e che AMN e AMD possono essere disciolte, mediante l'uso di condizioni basiche, sia durante l'estrazione del campione che durante la preparazione delle soluzioni standard (Ehling et al. 2007).

La combinazione tra fase stazionaria e fase eluente ha permesso una buona separazione degli analiti tra di loro e dal fronte del solvente (Figura 9).

La scelta di una lunghezza d'onda pari a 220 nm, che è risultata un compromesso tra i massimi di assorbimento dei MARC, ci ha consentito una buona rivelazione e quantizzazione di tutti e quattro gli anali

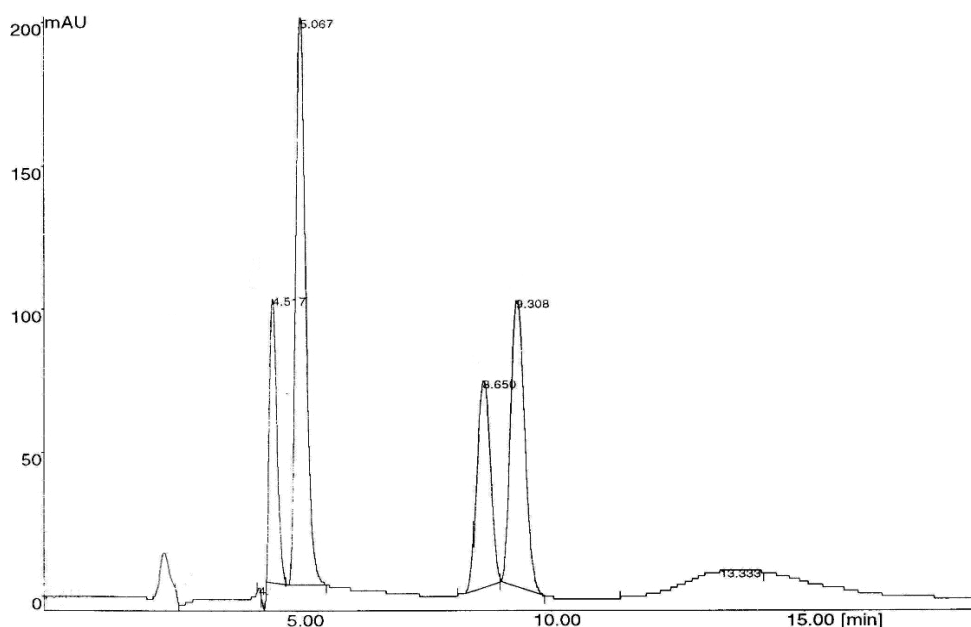


Figura 9. Cromatogramma di un campione di integratore proteico, arricchito con MEL, AMN ed AMD, 5 µg/mL, e CYA, 50 µg/mL

Conclusioni

I recenti episodi di adulterazione alimentare con melamina hanno spinto numerosi laboratori, privati e pubblici, a sviluppare nuovi metodi di analisi per la melamina e i composti correlati, inclusi acido cianurico, ammelina e ammelide, allo scopo di evidenziarne la presenza fraudolenta in una vasta gamma di prodotti alimentari (Tittlemier 2010).

I metodi analitici attualmente esistenti sono stati sviluppati dopo che nel 2007 si verificò, nel nord America, un problema relativo alla contaminazione con melamina ed acido cianurico di proteine degli alimenti per animali, glutine di frumento e riso (Ehling et al. 2007; Esteban 2007; Vail et al. 2007; Dobson et al.

2008; Garber 2008; Heller and Nochetto 2008; Kim et al. 2008; Muniz-Valencia et al. 2008).

Molti dei metodi finora pubblicati per l'analisi di alimenti prendono in considerazione la sola melammina e solo un esiguo numero di metodi sono stati messi a punto per l'analisi di melammina ed acido cianurico insieme (Turnipseed et al. 2008; Gratz et al. 2009); ciò potrebbe dipendere dalla difficoltà nell'analisi dei due composti causata dalla formazione di un precipitato salino di cianurato di melammina che si forma quando melammina ed acido cianurico si trovano insieme, sia nelle soluzioni standard che nei campioni di alimenti.

Il metodo sviluppato consente di analizzare quantitativamente la melamina ed i suoi congeneri in maniera rapida (presentando il vantaggio di utilizzare una singola colonna nella fase di analisi cromatografica per ottenere la separazione dei quattro composti) (Ehling et. 2007), utilizzando un'apparecchiatura a basso costo, prestandosi, quindi, all'analisi di routine di tali composti negli integratori.

La matrice impiegata rappresenta un altro elemento di novità, dato che in letteratura non esiste nessun lavoro a riguardo. L'integratore alimentare rappresenta certamente una matrice nuova ed insolita dato che in letteratura non esiste nessun lavoro a riguardo.

Bibliografia:

Andersen WC, Turnipseed SB, Karbiwnyk CM, Clark SB, Madson MR, Giesecker CM, Miller RA, Rummel NG, Reimschuessel R (2008) Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 56:4340–4347

Bradley EL, Boughtflower V, Smith TL, Speck DR, Castle L (2005) Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market. *Food Addit Contam.* 22:597–606

Chou S-S, Hwang D-F, Lee H-F (2003) High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry meats and eggs. *J Food Drug Anal.* 11:290–295:8–36

CNSA (Comitato Nazionale per la sicurezza alimentare) (2008) “Meccanismo di cessione della Melamina da contenitori per alimenti”. 20/11/2008

Dobson RL, Motlagh S, Quijano M, Cambron RT, Baker TR, Pullen AM, Regg BT, Bigalow-Kern AS, Vennard T, Fix A, et al. 2008. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicol Sci.* 106:251–262

Ehling S, Tefera S, Ho IP (2007) High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid. *Food Addit Contam.* 24:1319–1325

Esteban E (2007) LC/MS/MS screen for the presence of melamine in swine and poultry tissues. Food Emergency Response Network (FERN), Athens, GA, USA. FERN CHE. 0003.00:1–15

EUROPASS (2010) Parere scientifico sulla melamina negli alimenti e nei mangimi 13 aprile 2010

Filigenzi MS, Puschner B, Aston LS, Poppenga RH (2008) Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 56:7593–7599

FSIS (Food Safety and Inspection Service) (1991) Cyromazine and melamine. Chemistry Laboratory Guidebook Method R09. United States Department of Agriculture; Athens, GA, USA

Garber EA (2008) Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J Food Prot.* 71:590–594

GU (2004) Gazzetta Ufficiale del 15/07/2004. “Attuazione della direttiva 2002/46/CE, relativa agli integratori alimentari”

Gratz S, Gamble B, Heitkemper D (2009) Screen for the presence of melamine and cyanuric acid in milk-based and soy-based foods using LC-ESI-MSn. *Lab Inform Bull.* 4427:1–19

Heller DN, Nochetto CB. 2008. Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22:3624–3632

Ishiwata H, Inoue T, Yamazaki T, Yoshihira K (1987) Liquid chromatographic determination of melamine in beverages. *J Assoc Off Anal Chem.* 70:457–460

Kim B, Perkins LB, Bushway RJ, Nesbit S, Fan T, Sheridan R, Greene V (2008) Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J AOAC Int.* 91:408–414 *Food Additives and Contaminants* 143 91:408–414

Miller RW, Schmidtmann ET, Wauchope RD, Clegg CM, Herner AE, Weber H (1996) Urine delivery of cyromazine for suppressing house and stable flies (Diptera: Muscidae) in outdoor dairy calf hutches. *J Econ Entomol* 89:689–694

Ministero Della Salute, CSNA (2009) “Tenori massimi di Melammmina negli alimenti”. Parere n.2 del 12/03/2009. Available from: www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1149_allegato.pdf

Muniz-Valencia R, Ceballos-Magana SG, Rosales-Martinez D, Gonzalo-Lumbreras R, Santos-Montes A, Cubedo-Fernandez-Trapiella A, Izquierdo-Hornillos RC (2008) Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Anal Bioanal Chem.* 392:523–531

Patakioutas G, Savvas D, Matakoulis C, Sakellarides T, Albanis T (2007) Application and fate of cyromazine in a closed-cycle hydroponic cultivation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 55:9928–9935

Puschner B, Poppenga RH, Lowenstine LJ, Filigenzi MS, Pesavento PA (2007) Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. *J Vet Diagn Invest.* 19:616–624

Reimschuessel R, Giesecker CM, Miller RA, Ward J, Boehmer J, Rummel N, Heller DN, Nochetto C, de Alwis GK, Bataller N, et al. (2008) Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs. *Am J Vet Res.* 69:1217–1228

Sancho JV, Ibanez M, Grimalt S, Pozo OJ, Hernández F (2005) Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 530:237–243

Tittlemier SA, Lau BPY, Ménard C, Corrigan C, Sparling M, Gaertner D, Pepper K, Feeley M (2009) Melamine in infant formula sold in Canada: occurrence and risk assessment. *J Agric Food Chem.* 57:5340–5344

Tolleson WH, Diachenko DW, Folmer D, Doell D, Heller D (2008) Background paper on the chemistry of melamine alone and in combination with related compounds [cited 2009 Aug 19]. Available from: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_2.pdf/

Turnipseed SB, Casey C, Nochetto C, Heller DN (2008) Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS. *Lab Inform Bull* 24:1–13

Vail T, Jones PR, Sparkman OD (2007) Rapid and unambiguous identification of melamine in contaminated pet food based on mass spectrometry with four degrees of confirmation. *J Anal Toxicol.* 31:304–312

WHO (World Health Organization) (2008) Executive summary: expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid [cited 2009 Mar 10]. Available from: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Exec_Summary_melamine.pdf/

WHO (World Health Organization) (2009) Melamine contamination event [cited 2009 Mar 10]. Available from: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_events/en/index.html/

5. Descrizione delle tecniche

5.1 Estrazione in fase solida

L' estrazione in fase solida è una tecnica cromatografica che consente di raggiungere, mediante poche e semplici operazioni, tre obiettivi essenziali nel processo di purificazione di un analita: separazione dell'analita di interesse dai componenti interferenti della matrice; concentrazione dell' analita in piccoli volumi di solvente; ottenimento di soluzioni adatte all'analisi cromatografica mediante HPLC (che normalmente segue il processo estrattivo)

La purificazione mediante SPE si sviluppa in cinque fasi.

1. La cartuccia contenente la fase stazionaria solida viene “condizionata” con un solvente opportuno (i pori della fase solida si devono riempire di solvente).
2. Il campione (matrice + analita), sciolto in un solvente che abbia basso potere eluente nei confronti dell'analita, viene caricato sulla cartuccia; analita e matrice vengono così bloccati sulla fase solida.
3. Il solvente viene aspirato (alcuni componenti della matrice possono essere allontanati già in questa fase).
4. Si eseguono dei lavaggi con solventi (organici o acquosi aventi un opportuno valore di pH) che hanno lo scopo di allontanare tutti i componenti indesiderati presenti nella matrice.
5. Con piccoli volumi di un solvente avente alto potere eluente per l'analita si eluisce l'analita. Il solvente deve essere possibilmente adatto all'analisi successiva (cromatografia o spettrofotometria).

La “fase stazionaria” utilizzata in SPE è costituita da piccole particelle, pressoché sferiche, sulla cui superficie attiva l'analita viene trattenuto in seguito a fenomeni di

adsorbimento. In genere la superficie attiva è rugosa e presenta numerosi pori (micropori, del diametro di 1-2 nm, o mesopori, del diametro di 2-50 nm). In dipendenza della forma e grandezza dei pori e della loro tortuosità varia l'area superficiale.

La scelta appropriata del materiale adsorbente è critica per ottenere un efficiente recupero dell'analita. Un buon adsorbente deve essere in grado di adsorbire rapidamente, ed in maniera riproducibile, quantità definite dei componenti di interesse presenti nel campione. Inoltre deve:

- avere grande superficie di contatto;
- essere esente da impurezze rilasciabili al momento dell'eluizione;
- essere stabile nei confronti dei componenti del campione e del solvente di eluizione.

Gli adsorbenti usati in SPE sono essenzialmente di due tipi:

Adsorbenti su base silicea (gel di silice): sono costituiti da particelle di silice aventi un diametro di 40-60 μm , con pori di 65-75 Å e con un'area superficiale di 300-500 m^2/g . Possono essere facilmente funzionalizzati legando ai gruppi ossidrilici della silice gruppi polari, apolari, o ionici (silice in fase legata). Le fasi legate sono stabili a pH compresi tra 1.0 e 8.5;

Adsorbenti su base polimerica: il supporto è un polimero stirene –divinilbenzene altamente reticolato, con un'area superficiale di 700-1000 m^2/g e pori di 80-100 Å. Normalmente danno interazioni idrofobiche (interazioni π - π tra gli anelli benzenici del polimero e gruppi aromatici dell'analita), ma possono essere anche funzionalizzati sugli anelli benzenici con gruppi polari o ionici. Avendo un'area superficiale maggiore, consentono di caricare quantità maggiori di campione. Gli

adsorbenti polimerici possono essere utilizzati in vasto intervallo di pH (da 2.0 a 12.0).

Le caratteristiche dei solventi sono diverse:

- il **solvente per il caricamento**: deve sciogliere tutto il campione; non eluire l'analita;
- il **solvente per il lavaggio**: non deve eluire l'analita; eluire gli interferenti; creare l'ambiente adatto alla successiva eluizione dell'analita;
- il **solvente eluente**: deve avere potere solvente per l'analita; essere possibilmente volatile (nel caso si dovesse concentrare ulteriormente il campione); essere adatto all'analisi successiva.

I meccanismi di ritenzione dell'analita sulla fase solida vengono classificati in:

- **ritenzione in fase diretta** : fase stazionaria polare.

Si usano gel di silice; silice legata con alchili a basso n° di atomi di C portanti gruppi ossidrilici, amminici, ecc; polimeri funzionalizzati con gruppi fenolici o amminici. L'adsorbimento avviene tramite:

1. *interazioni dipolo-dipolo (8-15 KJ/mole)*
2. *legami a idrogeno (20-50 KJ/mole)*

- **ritenzione in fase inversa**: fase stazionaria apolare.

Si usano: silice funzionalizzata con alchili ad alto n° di atomi di C, resine polimeriche. L'adsorbimento avviene tramite:

1. *forze di Vander Waals*

- **ritenzione in fase ionica**: interazione tra analita ionico (basico o acido in forma salificata) e fase stazionaria ionica. Si usano silice o resine polimeriche funzionalizzate con:

- *gruppi acidi deprotonati ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$) salificati con cationi metallici (Na^+) → scambiatori cationici deboli e forti, rispettivamente;*
- *gruppi basici protonati ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NHR}_2^+$) salificati con anioni (Cl^-) --> scambiatori anionici deboli e forti, rispettivamente.*

L'adsorbimento avviene tramite:

1. interazioni elettrostatiche (attrazione tra cariche opposte)

- **ritenzione in fase mista:** fase stazionaria e analita con gruppi polari , apolari o ionici contemporaneamente.

La scelta corretta della fase stazionaria e dei solventi sono essenziali al fine di ottenere un buon recupero dell' analita.

Il **recupero dell' analita** da una colonnina di estrazione SPE viene calcolato misurando la quantità di analita eluita dall'adsorbente rispetto a quella originariamente caricata. Quindi il recupero totale (RT) dipende sia dall'efficienza dell' adsorbimento (EA) che dall'efficienza del deadsorbimento (ED):

$$\text{RT} = \text{EA} \times \text{ED}$$

5.2 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

La HPLC è una tecnica di cromatografia in fase liquida ad alta pressione ("High Pressure Liquid Chromatography") caratterizzata da elevate prestazioni (High Performance Liquid Chromatography) che permette di separare, caratterizzare e dosare i componenti di miscele complesse in tempi brevi. E' una delle tecniche di separazione più vantaggiose perché offre la possibilità di effettuare l'analisi di sostanze termolabili dal momento che non sono richieste temperature di esercizio elevate. Il processo cromatografico si basa sull'interazione tra l'analita, la fase stazionaria e la fase mobile, che, come già descritto nella SPE, può avvenire in

diversi modi in funzione delle caratteristiche della fase stazionaria (adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, ecc). Nella tecnica HPLC si impiegano fasi stazionarie caratterizzate da particelle di dimensioni comprese tra 3 -10 μm di diametro; pertanto, la fase mobile liquida deve essere fatta fluire attraverso la colonna utilizzando alte pressioni. La strumentazione necessaria per operare in HPLC comprende:

- il sistema di erogazione del/dei solventi;
- la/le pompe;
- il modulo manometrico;
- una valvola di iniezione collocata in testa alla colonna;
- la colonna;
- il rivelatore;
- l'integratore elettronico o il computer ed il registratore.

Sistema di erogazione solventi

Se l'apparecchiatura è dotata di un'unica pompa, la fase mobile, formata di solito da una miscela di due o più solventi, può essere preparata prima e posta in un unico contenitore da cui, passando attraverso appositi filtri, arriva alla pompa e quindi alla colonna. In alternativa, se il sistema è dotato di valvole dosatrici, si può programmare il prelievo automatico dei solventi dagli appositi contenitori ed effettuarne la miscelazione prima della pompa, ovvero a bassa pressione. Nel caso in cui l'apparecchiatura è dotata di più pompe, la miscela di fase mobile viene preparata automaticamente impiegando una pompa per ogni solvente. In questo procedimento la miscelazione avviene dopo il passaggio dei componenti attraverso le pompe e quindi ad alta pressione. Non è necessario programmare e preparare la

miscela all'interno del sistema se si effettua l'analisi mantenendo invariata la composizione della fase mobile (eluizione in condizioni *isocratiche*) mentre diventa indispensabile per eluizioni in *gradiente* (binario, ternario, quaternario), cioè quando la composizione viene modificata durante il processo cromatografico. Questa procedura viene applicata allo scopo di ottimizzare il processo separativo di miscele complesse riducendo i tempi di analisi pur mantenendo un'elevata risoluzione degli analiti.

Pompe

La pompa è uno degli elementi più importanti di un sistema operativo per cromatografia liquida. Essa deve poter garantire la massima riproducibilità e accuratezza del processo analitico mantenendo la stabilità della portata della fase mobile in colonna nonostante variazioni che possono derivare dalla viscosità dell'eluente, dal riempimento della colonna e da altri fattori. Il sistema di pompaggio serve a spingere la fase mobile all'interno della colonna con una pressione fino a 270 bar (4000 psi) per permettere di lavorare con flussi fino a 10 mL/min, necessari per effettuare separazioni a scopo preparativo. La pressione che si produce nel sistema è rappresentata dalla seguente equazione:

$$P = \eta VL / Kd^2$$

dove:

η = viscosità del solvente

V = velocità lineare del flusso

L = lunghezza della colonna

K = costante legata alle caratteristiche fisiche del riempimento della colonna

d = diametro della particelle della fase stazionaria

Risulta evidente che la pressione aumenta all'aumentare della viscosità del solvente e della lunghezza della colonna e al diminuire del diametro delle particelle di fase stazionaria.

Modulo manometrico

Il modulo manometrico è un modulo di misura della pressione minima e massima a cui lavorare, superati i quali il sistema si arresta. Ciò è soprattutto importante per prevenire rialzi bruschi e troppo elevati della pressione che provocherebbero danni irreversibili alla colonna con rottura del riempimento di fase stazionaria.

Valvola di iniezione

La valvola di iniezione, collocata in testa alla colonna, è dotata di un sottile tubo capillare (loop) che serve per introdurre il campione senza dover interrompere il flusso della fase mobile. A seconda delle applicazioni, il volume del loop è diverso: per scopi analitici il volume standard è di 20 μL , per scopi preparativi può arrivare a 2-3 mL, in funzione del diametro della colonna e del grado di separazione.

Colonne

La colonna per HPLC è costituita da un tubo di acciaio inossidabile riempito di fase stazionaria. In testa e in coda alla colonna sono presenti dei setti filtranti con porosità media di 2 μm che consentono il passaggio solo della fase mobile e degli analiti, impedendo l'ingresso in colonna di particelle estranee e la fuoriuscita di fase stazionaria. Per aumentare la durata della colonna cromatografica è opportuno utilizzare una *pre-colonna*, di pari diametro, lunga 2-3 cm, con riempimento uguale o con proprietà simili a quelle della fase stazionaria della colonna; l'uso della pre-colonna consente una pre-purificazione dell'analita, in quanto sono trattenute le impurezze con elevata affinità per la fase stazionaria. Le colonne di uso più comune sono lunghe tra 10 e 25 cm e hanno un diametro interno compreso tra 3 e 5 μm ; le particelle della fase stazionaria hanno un diametro medio di 5-10 μm . Quanto più le particelle sono fini (5-10 μm), di granulometria uniforme e forma

sferica, tanto più ridotto è il *volume morto* della colonna (ossia lo spazio vuoto del sistema in cui non avviene il processo cromatografico) e tanto più il campione è esposto ad un'ampia superficie di contatto con il riempimento della colonna. Per particelle di diametro maggiore (40-60 μm), il volume morto maggiore provoca allargamento delle bande per effetto della diffusione longitudinale (ossia lo spostamento spontaneo delle molecole in tutte le direzioni, per effetto dei gradienti di concentrazione che si generano nel tratto di colonna in cui la sostanza si trova) e di conseguenza picchi più larghi. Al di sotto di un certo diametro delle particelle (3 μm) la fase stazionaria risulta tanto impaccata da non consentire il passaggio della fase mobile. Per separazioni standard in scala analitica la quantità di campione è di pochi μg (10^{-6}) o decimi di μg (10^{-7}) mentre in scala preparativa si lavora con quantità dell'ordine delle decine o centinaia di mg o addirittura anche 1-2 g, in funzione delle dimensioni e delle prestazioni della colonna.

Le fasi stazionarie più comuni sono costituite :

- *da silice non modificata* (cromatografia di adsorbimento in fase diretta, in cui si instaurano interazioni polari tra gli analiti con i gruppi silanolici);
- *da silice derivatizzata* mediante legami chimici con:
 - *catene lipofile* (es. catene idrocarburiche lineari o ramificate) utilizzate nella cromatografia di ripartizione in fase inversa in cui si instaurano interazioni apolari;
 - *gruppi di varia polarità* (es. gruppi idrofilici, gruppi amminici, gruppi ciano) utilizzate nella cromatografia di ripartizione in fase diretta in cui si instaurano interazioni polari.

Rivelatori

I sistemi di rivelazione sono degli strumenti atti a misurare una determinata proprietà del liquido che proviene dalla colonna e arriva in una cella a flusso, dove

la risoluzione dei componenti il campione deve corrispondere a quella realizzata con il passaggio in colonna. In altre parole la cella deve avere forma e volumi tali (di solito 8-10 μL) che le bande corrispondenti ai singoli composti rimangano separate e non tendano ad allargarsi. Il rivelatore esamina il contenuto della cella e invia un segnale elettrico al registratore o al più moderno sistema di registrazione ed elaborazione dati di un computer. I rivelatori che possono essere usati in HPLC sono di vario tipo, scelti in funzione della natura dei composti da analizzare. Il più usato in ambito analitico-farmaceutico è il *rivelatore spettrofotometrico*, adatto all'analisi di composti che assorbono luce UV-visibile. Per applicazioni più specifiche si possono usare *rivelatori a fluorescenza*, *rivelatori a indice di rifrazione*, *rivelatori polarimetrici*, o altri ancora. Nel nostro lavoro è stato utilizzato un rivelatore a fluorescenza.

Rivelatore a fluorescenza

Permette di rivelare sostanze intrinsecamente fluorescenti o rese tali per derivatizzazione prima dell'iniezione in colonna o prima di arrivare al rivelatore. Il rivelatore si basa sull'emissione di fluorescenza da parte di sostanze sottoposte ad una radiazione di eccitazione ad una opportuna lunghezza d'onda. E' molto adatto alle analisi in campo biologico che richiedono sensibilità elevate per rilevare quantità inferiori al ng. Filtri appositi permettono di selezionare le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione. Questo tipo di rivelatore è dotato sia di elevata selettività che sensibilità, inoltre è poco flessibile a fluttuazioni del flusso di fase mobile e della temperatura.

7.Registratore (integratore o PC)

Il registratore, infine, fornisce il cromatogramma che rappresenta l'andamento del processo cromatografico in funzione del segnale che arriva dal rivelatore. L'integratore fornisce le aree dei picchi cromatografici, da cui si possono ricavare dati quantitativi della concentrazione dei componenti il campione in esame. La natura della fase stazionaria nonché le proprietà chimiche del campione da

analizzare e il tipo di rivelatore influenzano la scelta dei solventi da usare in miscela come fase mobile. In ogni caso requisito essenziale dei solventi è la loro completa miscibilità.

5.3 Gas Cromatografia (GC)

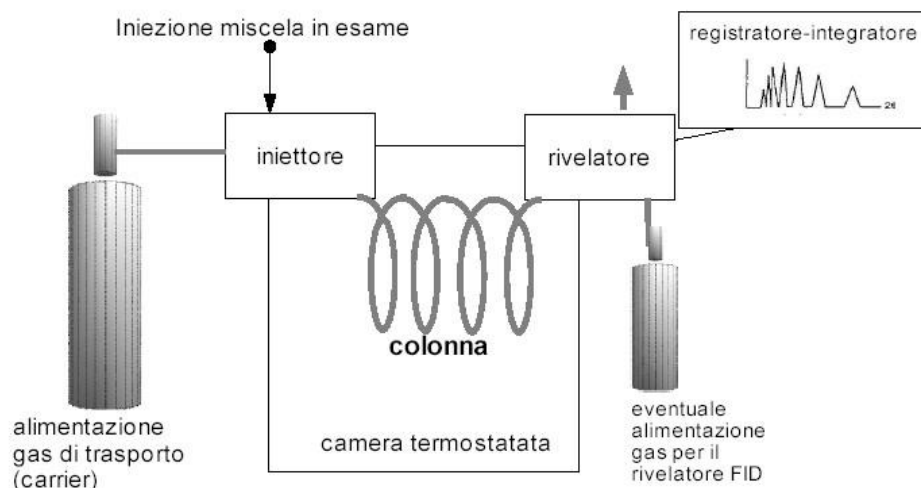
Nella tecnica gas-cromatografica la fase mobile è un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido. Secondo lo stato fisico della fase stazionaria, la gas-cromatografia si può suddividere in cromatografia gas solido (GSC) e in cromatografia gas liquido (GLC).

Questo metodo, che ha conosciuto un grande sviluppo a partire dagli anni '60, conserva tuttora una posizione di primo piano come tecnica analitica. L'unica limitazione della gas-cromatografia è la necessità di rendere volatili i campioni da analizzare, per cui in alcuni casi essa è soppiantata dall'*HPLC* (cromatografia liquida ad alto potere risolutivo).

I meccanismi di separazione relativi alla GC sono sostanzialmente due: ripartizione e adsorbimento. Il primo nel caso che la fase stazionaria sia liquida, il secondo quando è solida.

Strumentazione

Vediamo ora lo schema essenziale dello strumento, il gas-cromatografo, per poter capire l'intero processo di analisi:



Sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier)

Si tratta di bombole di gas inerte (azoto, elio, argon), talvolta può essere utilizzato anche l'idrogeno. Lo scopo principale è quello di trascinare i componenti della miscela in analisi lungo la colonna cromatografica.

Sistema di alimentazione dei gas per il rivelatore FID

Qualora si utilizzi un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) è necessario alimentare un combustibile ed un comburente (ad esempio idrogeno ed aria).

Iniettore o camera di iniezione

Il suo compito è assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione.

Poichè con l'uso di colonne capillari (vedi più avanti) la quantità di campione da iniettare è dell'ordine dei nanolitri, e misurare queste quantità con siringhe è praticamente impossibile (con apposite siringhe si arriva ai μL), sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione. Spesso si utilizzano quindi opportune tecniche (split, splitless) che consentono di far entrare effettivamente in colonna solo una parte (ad esempio ca. 1/100) del liquido iniettato.

La camera di iniezione è corredata da un sistema di resistenze variabili attraverso le quali è possibile fissare la temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela. L'introduzione del campione viene effettuata con una iniezione su un

apposito disco di gomma al silicone, posto tra una ghiera metallica e il dispositivo di attacco alla colonna.

Colonna

La colonna può essere di due tipi: *impaccata* o *capillare*.

L'impaccata (diametro interno 2-4 mm, lunghezza 1-4 m), usata nella gascromatografia classica, comporta una separazione in colonna di acciaio o di vetro (due metri circa) riempita di materiale inerte (supporto per la fase stazionaria) sul quale è distribuita una pellicola sottile di liquido (fase stazionaria) continuamente attraversata da un gas (fase mobile) detto gas di trasporto. Il processo di separazione è limitato dalla lentezza di eluizione delle molecole del campione lungo la colonna.

La capillare (diametro interno 0,1-0,8 mm, lunghezza 10-100 m), ormai di uso comune, rappresenta un'importante innovazione per la sua rapidità di eluizione e per una migliore risoluzione (il numero di picchi risolti, in metà tempo, è superiore di oltre quattro volte quello della colonna impaccata). Essa è molto più lunga dell'impaccata (anche cento metri), di diametro molto minore e quindi contiene una quantità molto minore di fase stazionaria, per cui la quantità di campione da iniettare è molto più piccola e viene eluita prima.

Le colonne sono alloggiare in una **camera termostatica**, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. Un dispositivo permette all'operatore di fissare la temperatura, la quale può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure fatta variare (programmata).

Rivelatore

I dispositivi in grado di rivelare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna, possono dividersi in universali e selettivi. I primi

consentono di individuare tutti i componenti di una miscela, i secondi rivelano solo particolari categorie di composti.

Tra i rivelatori più usati, si segnalano:

-Rivelatore a ionizzazione di fiamma (*FID*)

Si tratta di un rivelatore universale ma distruttivo in quanto i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso. Il carrier viene convogliato verso un ugello a cui giungono anche idrogeno ed aria, necessari per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito, quello caricato negativamente, è costituito dall'ugello stesso.

La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300V.

Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente e quindi rivelato con un segnale più intenso. Come già detto questo rivelatore è di tipo universale sono poche infatti le sostanze che hanno potenziali di ionizzazione così alti da non poter essere ionizzate nelle normali condizioni di lavoro (tra queste abbiamo acqua, solfuro di carbonio, anidride carbonica, ossido di carbonio, ossidi di azoto, ammoniaca, acido solfidrico, biossido di zolfo, acido formico, gas nobili, azoto e ossigeno). La sensibilità di questo rivelatore è molto elevata, infatti si può arrivare ai nanogrammi.

-Rivelatore a cattura di elettroni (*ECD*)

Si tratta di un rivelatore selettivo e non distruttivo. Esso è costituito da una sorgente radioattiva (^{63}Ni) che emette radiazioni beta (elettroni). Gli elettroni, detti primari,

emessi dalla sorgente, vengono a trovarsi in un campo elettrico di cui la sorgente costituisce l'anodo, mentre il catodo si trova verso l'uscita. Gli elettroni primari colpiscono il carrier formando ioni positivi ed elettroni secondari. Il flusso di queste cariche costituisce la corrente di fondo e dipende dalla differenza di potenziale tra i due elettrodi. Quando insieme al carrier è presente un'altra sostanza elettroaffine, cioè in grado di catturare gli elettroni secondari, si verifica una diminuzione di corrente di fondo. La corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un registratore. I limiti di rivelabilità possono essere molto bassi, ad esempio per i pesticidi cloro-organici o derivati del fosforo, si può arrivare a rivelare i picogrammi. Le sostanze maggiormente rivelate sono quelle contenenti alogeni.

-Rivelatore a termoconducibilità (HWD)

Si tratta di un rivelatore universale e non distruttivo. Si basa su due sensori contenenti un filamento la cui resistenza elettrica varia al variare della temperatura. La temperatura dipende a sua volta dalla conducibilità termica dei gas con cui sono a contatto i filamenti (e che varia con la composizione dei gas stessi). Un sensore è lambito dal carrier puro mentre l'altro è sull'uscita della colonna: un accurato sistema elettrico rileva ed amplifica le differenze dei due segnali. La sensibilità di questo rivelatore non è elevata ed inoltre costringe all'uso di carrier più costosi (ad esempio elio e argon).

Registratore e integratore

Il segnale in uscita dal rivelatore passa ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico.

I moderni strumenti sono corredati anche di un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi, operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo.

5.4 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa / carica (M/z).

A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*.

Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (ricordiamo che per ottenere uno spettro di massa, dunque, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa).

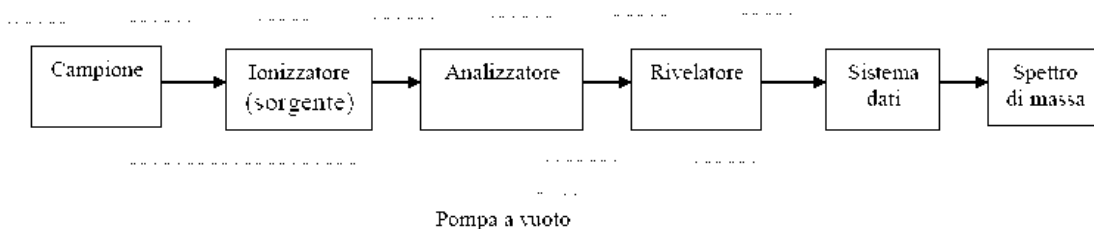
Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

6.4.1 Spettrometro di Massa

L'interpretazione dello spettro di massa consiste nello studio dei segnali dovuti agli ioni generati nell'esperimento, dai quali si può ricostruire a ritroso la struttura molecolare originale.

Lo spettrometro di massa si schematizza così:



Da notare che il vuoto (che si aggira intorno ai 10^{-6} – 10^{-5} torr) è necessario per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici.

➤ Introduzione del campione

(Sample Inlet System)

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può essere fatta sia allo stato solido, usando una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole che permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno.

La quantità di prodotto necessario per registrare uno spettro è dell'ordine dei microgrammi/nanogrammi.

E' possibile utilizzare l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa. Queste tecniche, note come GC-MS e HPLC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti.

➤ Camera di ionizzazione

Se una molecola è investita in fase vapore da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica si può avere per urto la sua ionizzazione a ione positivo o negativo.

In genere gli strumenti sono regolati per lavorare unicamente con ioni positivi, i quali possono spontaneamente o per urto decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri.

Ogni molecola avrà quindi una sua *frammentazione caratteristica e specifica* che dipenderà sia dalla natura delle molecole sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una **sorgente ionica** che varia a seconda della tecnica utilizzata.

In genere gli elettroni sono emessi da un filamento caldo di tungsteno o renio, e passano attraverso un condotto, che crea il raggio, nella parte centrale della camera che contiene il campione gassoso.

La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa.

Tra i vari dispositivi alcuni consentono di analizzare solo frammenti positivi, altri invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi.

Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (TECNICHE HARD), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (TECNICHE SOFT).

➤ SORGENTI

In base al **tipo di sorgente** utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

- impatto elettronico (E.I.)
- ionizzazione chimica (C.I.)
- electrospray (E.S.I.)

• IMPATTO ELETTRONICO (E.I.)

Electronic Impact Ionization

La ionizzazione per impatto elettronico è la tecnica più comune.

Un filamento di tungsteno incandescente emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo posto dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia (ca. 70 eV). Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola (impatto elettronico), le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un radical catione (**ione molecolare**) $M^{+\bullet}$.

Siccome l'energia necessaria per ionizzare una molecola organica è di circa. 13-14 eV, i radical cationi sono prodotti ad un'energia vibrazionale molto alta, che ne può determinare la frammentazione con formazione di un radicale e un catione.

Tutti gli ioni positivi (cationi e radical cationi) sono respinti da una piastra, tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate, tenute a potenziale positivo crescente, dette piastre acceleratrici.

Questo tipo di ionizzazione è *hard*. Gli ioni vengono generati ad un livello energetico molto alto e si possono avere frammentazioni estese che lasciano poco o nulla dello ione molecolare.

Per risolvere questo problema sono state messe a punto altre tecniche di ionizzazione, dette tecniche *soft* (e sono le seguenti).

- **IONIZZAZIONE CHIMICA (C.I.)**

Chemical Ionization

La ionizzazione chimica viene utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente.

Questa è una tecnica di ionizzazione più "mild", che si basa sull'interazione del campione vaporizzato con un reagente ionizzato, che di solito è un acido di Bronsted gassoso.

I più usati reagenti di questo tipo sono quelli che derivano dalla ionizzazione ad impatto elettronico del metano.

Se la molecola M ha un'affinità per il protone più alta di quella del metano, allora si avrà la formazione dello ione $M-H^+$ e nello spettro vedremo lo ione molecolare + 1.

In pratica il metodo consiste nell'introdurre, insieme al campione, del metano in forte eccesso. Statisticamente sarà il metano ad essere ionizzato per impatto elettronico, generando CH_4^+ ; questo, incontrando un'altra molecola di CH_4 , forma CH_3 e CH_5^+ , che funziona da acido per una molecola organica M generando l'acido coniugato MH^+ .

Questa specie non viene generata ad un livello vibrazionale eccitato, e non frammenta.

- **IONIZZAZIONE ELETTROSPRAY (E.S.I.)**

Electron Spray Ionisation

Il campione, sciolto in un solvente polare, è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico.

Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il sovente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore.

Questa tecnica di ionizzazione è largamente usata negli strumenti HPLC-MS.

➤ **ANALIZZATORE**

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

I più comuni sono:

- L'ANALIZZATORE MAGNETICO
- L'ANALIZZATORE A DOPPIA FOCALIZZAZIONE
- L'ANALIZZATORE A QUADRUPOLO
- L'ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

- **ANALIZZATORE MAGNETICO**

E' l'analizzatore più usato, perchè consente di ottenere le risoluzioni migliori.

E' costituito da un tubo lungo circa 1 metro, piegato con un raggio di curvatura r ed immerso in un campo magnetico H .

Gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore e, per effetto del campo magnetico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria rettilinea (deflessione). La nuova traiettoria curvilinea ha un raggio di curvatura r che è direttamente proporzionale alla quantità di moto dello ione (mv) e inversamente proporzionale al campo magnetico H .

Le relazioni in gioco sono le seguenti:

$$\text{Energia cinetica degli ioni: } \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$$

z = carica dello ione;

V = potenziale di accelerazione

$$\text{Interazione campo magnetico / ione: } H \cdot z = \frac{m \cdot v}{r} \quad Hz = mv/r$$

H = intensità del campo magnetico

r = raggio di deflessione

Poichè dall'energia cinetica degli ioni abbiamo che:

$$v^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V}{m}$$

Combinando la prima espressione con la seconda si ottiene:

$$H^2 \cdot z^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V \cdot m}{r}$$

$$\frac{m}{z} = r^2 \cdot \left(\frac{H^2}{2V} \right)$$

Di conseguenza ***per un certo valore della coppia H e V esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo r' .***

Gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no.

Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo H è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.

Gli ioni che escono dal tubo vengono raccolti da un fotomoltiplicatore, che traduce l'intensità degli ioni in corrente elettrica (Rivelatore). Gli strumenti sono tarati (si usano dei perfluorocheroseni) in modo che a ciascun valore di campo corrisponda un certo valore di massa. In questo modo la corrente ionica è registrata in funzione non del campo B , ma della massa m . Si ottiene così lo *spettro di massa*, che è un istogramma che riporta in ascisse i valori di massa crescente (gli strumenti sono tarati in genere da 30 a 1000 uma) e in ordinate la corrente ionica.

- **ANALIZZATORE A DOPPIA FOCALIZZAZIONE**

Aggiungendo dopo l'analizzatore magnetico un filtro elettrostatico il percorso degli ioni positivi viene focalizzato ulteriormente in direzione dal campo elettrico statico .

Nel settore elettrostatico gli ioni non vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro energia traslazionale; questo perché altrimenti nel settore successivo, quello magnetico, ioni con ugual rapporto m/z ma differente energia traslazionale seguirebbero traiettorie diverse, diminuendo la risoluzione dello strumento.

Così la risoluzione può raggiungere 100'000 e oltre. Ciò permette di misurare la massa esatta fino alla quarta cifra decimale. Gli spettrometri ad alta risoluzione di questo genere sono apparecchiature complicate e costose, e quindi il loro impiego non è molto diffuso per misure di

- **ANALIZZATORE A QUADRUPOLO**

E' costituito da quattro barre cilindriche metalliche, lunghe circa 20 cm., che delimitano il "cammino" percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector.

Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, in modo che quando le due sbarre verticali hanno potenziale positivo quelle orizzontali l'hanno negativo, e viceversa.

Gli elettroni, accelerati dalle piastre acceleratrici, entrano nel tunnel delimitato dalle barre e vengono respinti dai poli positivi ed attratti dai negativi.

Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e finiscono con lo scaricarsi su una delle barre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, hanno un'energia cinetica tale per cui il moto diventa sinusoidale e riescono ad uscire dal tunnel ed entrare nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore).

Operando quindi una scansione di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire ioni a massa molecolare crescente. Rispetto all'analizzatore a tubo il quadrupolo ha una risoluzione più bassa (< 1000), ma tempi di scansione più bassi e un minor costo.

• ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

Può essere considerato una variante dell'analizzatore a quadrupolo; qui infatti, anzichè permettere agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, la trappola ionica trattiene tutti gli ioni al suo interno.

Questa variante dell'analizzatore a quadrupolo usa tre elettrodi (un elettrodo anulare posto fra due elettrodi semisferici di entrata e uscita) per intrappolare ed accumulare gli ioni in una cavità di volume ristretto, la cosiddetta trappola ionica (ion trap), allo scopo di ottenere una elevata sensibilità. I due elettrodi laterali hanno un piccolo foro al centro attraverso il quale passano gli ioni.

Lo spettro di massa è generato variando il potenziale elettrico in modo da espellere in sequenza dalla trappola verso il rivelatore gli ioni secondo un valore m/z crescente.

- **ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO (TOF)**

Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni di differente valore massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione.

Ne deriva che il tempo che ciascuno mette per attraversare l'analizzatore è differente.

- **RIVELATORE**

Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata.

Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

Naturalmente nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza, che a sua volta è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa.

- **LO SPETTRO DI MASSA**

Lo spettro di massa si presenta quindi come un insieme di linee verticali (picchi) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento.

Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo ione molecolare.

Dallo spettro di massa si può risalire dunque alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti.

Nell'interpretazione di uno spettro si segue una procedura abbastanza semplice:

- identificazione dello ione molecolare.
- identificazione di ioni caratteristici.
- identificazione di processi di frammentazione caratteristici.
- ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard